

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS



Comparación de las pruebas Fluorescencia Polarizada, Rosa de Bengala, Rivanol e Inmunodifusión Radial con un sistema ELISA indirecto que utiliza antígeno de cepas rugosas de *Brucella spp* para discriminar animales infectados con *Brucella abortus* de *Yersinia enterocolítica* O: 9

TESIS
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS

PRESENTA:
MVZ. Carolina Orozco Cabrera

Director de Tesis
Dra. Rosa María Bermúdez Hurtado

Comparación de las pruebas Fluorescencia Polarizada, Rosa de Bengala, Rivanol e Inmunodifusión Radial con un sistema ELISA indirecto que utiliza antígeno de cepas rugosas de *Brucella spp* para discriminar de animales infectados con *Brucella abortus* de *Yersinia enterocolítica* O: 9. Tesis presentada por Carolina Orozco Cabrera, como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias Veterinarias, que ha sido aprobada por el comité particular indicado:

Dra. Rosa María Bermúdez Hurtado
Director de Tesis

Ph.D. Francisco Javier Monge Navarro
Co-Director de Tesis

Dr. Gilberto López Valencia
Asesor

Dr. José Carlomán Herrera Ramírez
Asesor

AGRADECIMIENTOS

A mi Directora de tesis Dra. Rosa María Bermúdez Hurtado por su total confianza, apoyo, aceptarme como su tutorada y todas sus enseñanzas.

Al Dr. Francisco Monge Navarro por el apoyo en la realización de todo el proyecto.

Al Dr. Gilberto López Valencia por su apoyo y enseñanzas al igual que al Dr. José Carlomán Herrera Ramírez.

Al Dr. Efrén Díaz Aparicio y la Dra. Gabriela Palomares Reséndiz por sus atenciones en la realización de la estancia en INIFAP-CENID-SAGARPA.

A la Universidad Autónoma de Baja California, el Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y el programa CONACYT, por darme la oportunidad de seguirme preparando y superando como profesionista.

Al PhD. Klaus Nielsen así como a Peace River Biotechnology Company por haber proporcionado el kit diagnóstico iELISA utilizado en este estudio.

Al Dr. Alberto Barreras Serrano por sus asesorías.

A mis maestros que tardaría mucho en mencionar a cada uno de ellos pero que sepan que están plasmados en estas páginas todos y cada uno de los conocimientos que me brindaron durante mi carrera.

DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico primeramente a dios y a mi madre María Guadalupe Cabrera Domínguez, por darme la vida, por ser la mayor inspiración, el más grande apoyo para lograr todas mis metas y por ser la primer y la mejor maestra, a mi esposo por su compañía e inteligencia, al igual que mi hijo el más grande tesoro y la principal motivación a salir adelante, mi abuelo que es y siempre será mi padre, a mis suegros José María Ávila Hernández y Dra. Marina del Pilar Olmeda García por su incondicional apoyo y fuente de inspiración profesional.

Gracias...

RESUMEN: Se analizaron 377 muestras de suero por medio de las pruebas Rosa de Bengala (RB), Rivanol (RIV), Inmunodifusión Radial con Hapteno Nativo (IRHN), ELISA indirecto que utiliza antígeno de cepa rugosa de *Brucella spp.* (ELISA) y Fluorescencia Polarizada (FP). Adicionalmente, se analizaron 10 muestras de suero de animales procedentes de un establo certificado libre de brucelosis a quienes se les inocularon cultivos puros de *Yersinia enterocolítica* O:9 (*Yersinia*). Utilizando FP como prueba de referencia, la prueba de RB obtuvo 80.87% de sensibilidad, 98.97% de especificidad y coeficiente Kappa (K) de 80.25%; la prueba de RIV obtuvo 84.15% de sensibilidad, 95.36% de especificidad con K de 79.76; la prueba de IDRHN obtuvo 65.03% de sensibilidad, 99.48% de especificidad y K de 65.15 y ELISA con 85.25% de sensibilidad, 95.88% y K de 81.36. Las diez muestras de animales inoculados con *Yersinia* produjeron reacciones cruzadas falsas positivas para RB y RIV mientras que para el ELISA solo un animal resultó positivo y nueve negativos a esta prueba. Para FP, ocho animales resultaron positivos y solo dos negativos. Se concluye que las pruebas RB y RIV son suficientes para detectar animales infectados con *Brucella abortus* en nuestro medio y que además existe la disponibilidad de herramientas de escrutinio serológico con tecnología capaz de diferenciar animales brucelosos de aquellos infectados con organismos con alta homología y que no interfieren con el resultado de las pruebas serológicas.

Palabras clave: *Brucella*, *Yersinia*, Rosa de Bengala, Rivanol, Fluorescencia Polarizada, ELISA, reacciones cruzadas.

ABSTRACT: 377 serum samples were analyzed by means of the Rose Bengal test (RB), Rivanol (RIV), Radial immunodiffusion with Native Hapten (IRHN), indirect ELISA using antigen rough strain of *Brucella* spp. (ELISA) and fluorescence polarization (FP). Additionally, 10 serum samples from animals from a brucellosis-free certificate barn who were inoculated with pure cultures of *Yersinia enterocolitica* O:9 were analyzed (*Yersinia*). Using FP as the reference test, RB test scored 80.87% sensitivity, 98.97% specificity and Kappa coefficient (K) of 80.25%; RIV test scored 84.15% sensitivity, 95.36% specificity with K 79.76; IDRHN test obtained 65.03% sensitivity, specificity 99.48% and K 65.15% and ELISA sensitivity of 85.25% and 95.88% specificity with 81.36 K. Ten samples of animals inoculated with *Yersinia* produced false positive cross-reactions to RB and RIV, while for ELISA only one animal was positive and nine were negative. For FP, eight animals were positive and only two negative.

It is concluded that the RB and RIV tests are sufficient to detect animals infected with *Brucella abortus* in our midst and that there is availability of serological screening tools with technology capable of differentiating brucellosis infected animals of those infected with organisms with high homology and do not interfere with the results of serological tests.

Keywords: *Brucella*, *Yersinia*, Rose Bengal, Rivanol, Polarized fluorescence, ELISA, cross-reactions.

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
<i>Sinonimia</i>	4
<i>Etiología</i>	4
<i>Transmisión</i>	6
<i>Epidemiología</i>	7
<i>Inmunopatogénesis</i>	8
<i>Signos clínicos</i>	10
<i>Diagnóstico</i>	11
<i>Métodos directos</i>	12
<i>Método indirectos</i>	13
<i>Pruebas serológicas</i>	13
<i>Otras pruebas</i>	15
<i>Terapia antimicrobiana</i>	18
<i>Prevención y control</i>	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
<i>Ubicación</i>	20
<i>Unidades experimentales</i>	20
Procedimientos.....	21
<i>Recolección y procesamiento de las muestras</i>	21
<i>Pruebas de laboratorio</i>	21
<i>Rosa de Bengala</i>	22
<i>Rivanol</i>	22
<i>Inmunodifusión radial</i>	23
<i>IELISA®</i>	23

<i>Fluorescencia Polarizada</i>	24
<i>Inoculación experimental con Yersinia enterocolítica O: 9</i>	25
<i>Protocolo de inoculación</i>	26
<i>Análisis de estadístico</i>	27
RESULTADOS.....	28
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	34
LITERATURA CITADA.....	37

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Pág.
1. <i>Brucella spp</i> , especie, cepa y huéspedes.....	5
2. Sensibilidad y Especificidad de las pruebas diagnósticas.....	17
3. Estatus según las unidades de mP para FP.....	25
4. Resultados positivos, negativos y porcentajes obtenidos para cada una de las pruebas serológicas.....	29
5. Valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de las pruebas de diagnóstico serológico.....	30
6. Coeficiente Kappa de las pruebas diagnósticas empleando la fluorescencia polarizada como prueba de referencia.....	31
7. Resultados de las pruebas serológicas en sueros de animales inoculados con <i>Yersinia enterocolítica</i> O:9.....	33
8. Resultados del sistema ELISA que utiliza antígeno rugoso de <i>Brucella abortus</i> por grupos de densidad óptica.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pág.
1. Brucelosis bovina (<i>Brucella abortus</i>). Transmisión.....	6
2. Situación actual de la Campaña Nacional Contra la Brucelosis de los Animales, NOM -041-ZOO-1995.....	7
3. Esquema simplificado de la membrana externa de la pared celular de <i>Brucella</i> . El LPS-S está constituido por el lípido A, el núcleo y el polisacárido O (PSO). El LPS-R carece de cadena "O".....	9

INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad zoonótica de distribución mundial causada por bacterias del género *Brucella*, donde *Brucella abortus* (*B. abortus*) es la cepa más prevalente, ocasiona importantes pérdidas económicas por disminución en la producción de leche, abortos y problemas reproductivos tanto en bovinos como en otras especies (Godfroid et al., 2005; Gwida et al., 2010).

En México, la brucelosis en bovinos ha sido descrita desde el siglo XIX, no obstante, fue hasta el año 1921, en el estado de Puebla, donde el Dr. Pláceres aisló por primera vez *Brucella mellitensis* (DGE, 2012). El diagnóstico serológico de la enfermedad inició hace más de 100 años con una simple prueba de aglutinación (Nielsen, 2002; Gall and Nielsen, 2004; Nielsen and Yu, 2010). En la actualidad, el diagnóstico de la brucelosis bovina está basado casi exclusivamente en pruebas serológicas (Godfroid et al., 2002). En México, las pruebas oficiales utilizadas en las campañas de control y erradicación de la brucelosis bovina incluyen un esquema doble de diagnóstico que utiliza la prueba Rosa de Bengala como método de escrutinio inicial y la confirmación mediante la prueba de Rivanol, el diagnóstico oficial se realiza por medio de estas técnicas serológicas (Godfroid et al., 2002; NOM-041-ZOO-1995). La Oficina Internacional de Sanidad Animal (OIE) sugiere el uso de las pruebas anteriores así como la aplicación de ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) para el diagnóstico de la enfermedad.

A lo largo del tiempo se descubrió que las pruebas serológicas empleadas para el diagnóstico de la brucelosis en el ganado eran susceptibles de producir reacciones falsas positivas, debido a la presencia de antígenos homólogos de otros patógenos, lo que da lugar a reacciones cruzadas que producen resultados falsos positivos (Nielsen, 2002). La vigilancia epidemiológica de las campañas de brucelosis bovina están fuertemente influenciadas por la presencia de estas reacciones serológicas, debido a infecciones paralelas con otras bacterias gram negativas que comparten determinantes antigénicos con la cadena de antígenos O de *Brucella spp* (Chenais et al., 2012). Sin embargo, sólo las reacciones cruzadas con *Yersinia enterocolítica* O: 9 son relevantes en el diagnóstico de rutina de la brucelosis bovina (Mainar-Jaime et al., 2005).

La presencia de reacciones cruzadas entre infecciones producidas por *Brucella abortus* y otras bacterias pueden ser reducidas utilizando antígenos O de *Brucella spp* de cepas rugosas en las pruebas serológicas. Los antígenos O de cepas rugosas de *Brucella spp* se caracterizan por expresar una conformación genética que produce una secuencia de proteínas altamente inmunogénicas que no presentan homología alguna con otras bacterias (Kim et al., 2014). Los antígenos O de cepas rugosas de *Brucella spp* pueden ser fácilmente adaptados a distintas plataformas de diagnóstico incluyendo la prueba de tarjeta, Western blot y ELISA.

Con base a lo anterior, el objetivo del presente estudio es comparar los niveles de sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo y valor predictivo positivo de las pruebas de rutina basadas en antígeno de lipopolisacárido de *Brucella abortus* de cepa lisa con un sistema ELISA indirecto basado en un antígeno de cepas rugosas de *Brucella spp.*

El estudio está organizado en dos secciones:

1. Comparación de pruebas diagnósticas Fluroescencia polarizada (FP), Rosa de Bengala (RB), Rivanol (RIV), Inmunodifusión Radial (IDR) y ELISA indirecto (iELISA) en muestras de bovinos serológicamente positivos y negativos a brucelosis.
2. Comparación de pruebas diagnósticas FP, RB, RIV, IDR y iELISA, en muestras de bovinos serológicamente negativos a brucelosis, inoculados experimentalmente con *Yersinia enterocolítica* O: 9.

REVISIÓN DE LITERATURA

Brucelosis bovina

Sinonimia

Fiebre del Mediterráneo, fiebre ondulante, fiebre de Malta, aborto infeccioso, enfermedad de Bang (Díaz et al., 2001).

Etiología

La brucelosis bovina es causada por *Brucella abortus* (*B. abortus*) es considerada como la principal especie patógena en todo el mundo y es la principal responsable de la brucelosis bovina (Godfroid et al., 2010). Las bacterias del género *Brucella*, son bacterias Gram-negativas, cocobacilos pequeños, de 0.5 a 0.7 micras (μm) de diámetro por 0.6 a 1.5 μm de largo, no motiles, sin esporas ni cápsula, son microorganismos intracelulares facultativos, que puede infectar a muchas especies animales y al hombre (Gwida et al., 2010).

Fueron descritas en 1887 por un médico militar de la Armada Británica llamado David Bruce, de ahí el nombre del género, *Brucella* (Moreno, 2014) Bruce aisló e identificó la cepa *Brucella mellitensis* (*Micrococcus mellitensis*) la primera especie conocida de este género (Godfroid et al., 2005). Posteriormente en el año de 1897 *Brucella abortus* fue aislada de abortos en bovinos por el veterinario Benhard Bang (Godfroid et al., 2005; Nielsen and Yu, 2010; Moreno, 2014).

Su clasificación se basa principalmente en las diferencias entre patogenicidad y la especie a la que infecta, la diferencia entre las distintas especies de *Brucella* se logra a través de la caracterización fenotípica de antígenos lipopolisacáridos (LPS) (Godfroid et al., 2010). Se reconocen diez especies dentro del género *Brucella* de las cuales, seis son consideradas como especies clásicas: *Brucella abortus*, *Brucella mellitensis*, *Brucella suis*, *Brucella ovis*, *Brucella canis* y *Brucella neotomae* (Godfroid et al., 2010; Chenais et al., 2012) y cuatro especies recién ingresadas al género: *Brucella pinnipedialis*, *Brucella ceti*, *Brucella microti* y *Brucella inopinata*. En México se han aislado 5 de las 10 especies de *Brucella* (Luna y Mejía, 2002). Las diferentes especies de *Brucella* se clasifican habitualmente como cepas que producen colonias lisas (Avila-Calderon et al., 2013) o colonias rugosas (Cuadro 1). El aspecto liso o rugoso que adquieren las colonias se debe a la expresión del LPS en la superficie bacteriana (Castro et al., 2005).

Cuadro 1. *Brucella spp*, especie, cepa y huéspedes

Especie	Cepa	Huésped	Huésped Accidental
<i>B. abortus</i> *	Lisa(S)	Bovina	Humano, ovino, caprino, equino y canino
<i>B. mellitensis</i> *	Lisa(S)	Cabra	Humano, ovino y bovino
<i>B. suis</i> *	Lisa(S)	Cerdo	Humano y bovino
<i>B. ovis</i> *	Rugosa(R)	Ovinos	Humano
<i>B. canis</i> *	Rugosa(R)	Caninos	Humano
<i>B. neotomae</i>	Lisa(S)	Ratón de desierto	Desconocido
<i>B. ceti</i>	Lisa(S)	Delfín, ballena	Marsopa
<i>B. pinnipedialis</i>	Lisa(S)	Foca	Desconocido
<i>B. microti</i>	Lisa(S)	Roedor de campo y zorro	Desconocido
<i>B. innopinata</i>	Lisa(S)	Desconocido	Desconocido

*En México

(Adaptado de Luna y Mejía, 2002; Godfroid et al, 2010)

Transmisión

B. abortus se puede transmitir de forma horizontal o vertical. Durante la transmisión vertical, se ha reportado que 60 a 70 % de becerros nacidos de madres infectadas presentaran infección (Díaz Aparicio, 2013). Se ha demostrado, que la forma más común de contagio es por contacto directo con placentas, fetos, fluidos fetales y vaginales, tejidos y vísceras de animales infectados, sangre, heces y semen, este último solo es de importancia para transmisión de *Brucella* cuando se utiliza la vía de inseminación artificial (Figura 1). La bacteria también puede encontrarse en leche y subproductos de la leche provenientes de animales enfermos (Díaz Aparicio, 2013).

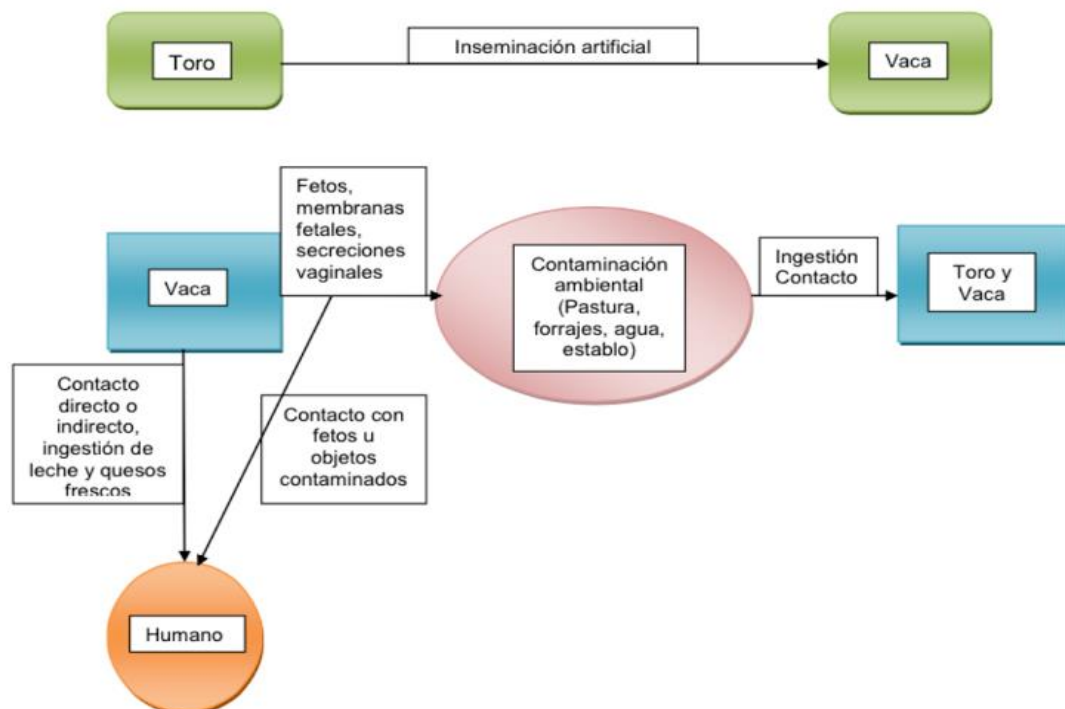


Figura 1. Brucelosis bovina (*Brucella abortus*). Transmisión. (Adaptado de Acha N., 2001).

Epidemiología

La brucelosis es una enfermedad de distribución mundial de gran relevancia debido a que afecta tanto la salud humana como la animal. En México, se considera como un problema prioritario de salud pública y de notificación obligatoria ante la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), por lo que se realizan grandes esfuerzos para lograr su control y prevención (Figura 2) (OIE, 2012).



Figura 2. Situación actual de la Campaña Nacional Contra la Brucelosis de los Animales, NOM-041-ZOO-1995.

Las tasas de incidencia y prevalencia que se reportan para brucelosis bovina varían entre países y sus regiones. La brucelosis bovina causada por *B. abortus* es la forma más ampliamente distribuída en América, así como en otras regiones en desarrollo. Algunos países del centro y norte de Europa, Canadá,

Japón, Australia y Nueva Zelanda son considerados libres de esta enfermedad (Gwida et al., 2010). Varios países de la unión europea que no se encuentran libres manejan prevalencias menores al 1% (Díaz Aparicio, 2013).

Inmunopatogénesis

Al ser una bacteria intracelular facultativa, una vez que ingresa a través de la vía oral, mucosa o conjuntiva, entra en función el componente antigénico más importante de la superficie de *Brucella*, los lipopolisacáridos (LPS) (Cloeckaert et al., 1998). La característica de los LPS u O-PS (Figura 3), en bacterias del género *Brucella* de cepa lisa es la capacidad de resistencia a los anticuerpos y el sistema complemento presentes en el suero, una característica poco común en el O-PS de otros patógenos gram-negativos, el O-PS en bacterias gram negativas también modula la entrada a las células (Conde et al., 2012). Después de ingresar al organismo son fagocitadas por neutrófilos y macrófagos (Gorvel and Moreno, 2002) donde sobreviven y se multiplican en el retículo endoplásmico de estas células inhibiendo los mecanismos bactericidas y la unión fagolisosoma (Martirosyan et al, 2011; Oliveira et al., 2012), la acidificación de la vacuola que la contiene es requerida para la supervivencia intracelular (Carvalho Neta et al.,2010; Wang et al., 2014). Posteriormente alcanzan la vía linfática y se multiplican en ganglios regionales al sitio de entrada (Martirosyan et al., 2011), se diseminan vía hematógena causando bacteremia para localizarse en órganos del sistema retículo endotelial especialmente bazo, hígado, ganglios, médula ósea, y riñón. Los macrófagos

transportan las bacterias hacia órganos reproductivos, glándula mamaria, y en su caso tejidos fetales (Gorvel, 2008; Acha N., 2001), donde son atraídas a estas áreas por la presencia de eritritol el cual es un polialcohol por el cual presentan una gran afinidad, es metabolizado por *Brucella abortus* se presume que como fuente de carbón y energía (Díaz Aparicio, 2013). Al invadir y multiplicarse en trofoblastos provocan inflamación y necrosis, causan lesiones a la pared del órgano provocando endometriosis ulcerosa de los espacios intercotiledonarios, provocando que la circulación materno-fetal se vea comprometida causando la muerte y expulsión fetal, entre el quinto y noveno mes de gestación (Carvalho Neta et al., 2010; Díaz Aparicio, 2013).

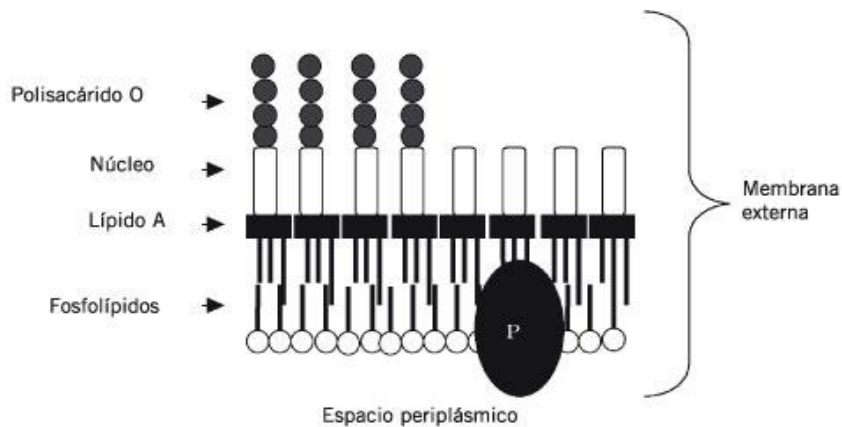


Figura 3. Esquema simplificado de la membrana externa de la pared celular de *Brucella*. El LPS-S está constituido por el lípido A, el núcleo y el polisacárido O (PSO). El LPS-R carece de cadena "O" (Castro et al., 2005).

Signos clínicos

El aborto en el último tercio de la gestación es la manifestación más evidente de brucelosis (Carvalho Neta et al., 2008), sin embargo, este signo clínico ocurre regularmente solo en la primera gestación. Por lo general, las hembras infectadas abortan sólo una vez, a pesar de que pueden permanecer infectadas de por vida. El diagnóstico clínico de la brucelosis en los animales se basa en la ocurrencia de abortos; sin embargo, esto puede ser erróneo, ya que muchos otros patógenos pueden inducir el aborto (Padilla et al., 2010). La confirmación del diagnóstico de brucelosis a través de pruebas de laboratorio es por lo tanto esencial (Godfroid et al., 2010).

Las infecciones por *Brucella* también ocasionan el nacimiento de becerros muertos o débiles, retención placentaria y disminución en la producción de leche, también se puede presentar disminución en los parámetros de fertilidad como consecuencia de infecciones secundarias tras el aborto, además de otras pérdidas originadas por la transmisión de la enfermedad en el hato (Gwida et al., 2010). En toros, la brucelosis produce orquitis y epididimitis debido a las afectaciones de vesículas seminales, testículos y epidídimos, por lo que es común encontrar a estos microorganismos presentes en el semen (Chenais et al., 2012).

Diagnóstico

El diagnóstico definitivo y prueba de oro de la enfermedad se logra a partir del aislamiento bacteriológico de muestras de exudado vaginal y productos fetales, entre otros (Gwida et al., 2010); sin embargo, debido al riesgo biológico que representa, así como la ineficiencia en el cultivo, los costos, y otros factores, la mayoría de los laboratorios eligen utilizar otros métodos diagnósticos que representen un mayor costo beneficio (Nielsen K., Yu WL, 2010). Por lo que se opta por el uso casi exclusivamente de pruebas serológicas (Godfroid et al., 2002) que aunque son procedimientos indirectos, en conjunto permiten aumentar los niveles de sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de la enfermedad. Este tipo de pruebas se fundamentan en el desarrollo de anticuerpos, contra *Brucella*, los cuales son utilizados como medio detectable (OIE, 2012). Muchas pruebas serológicas que han sido utilizadas para el diagnóstico de la brucelosis, se basan en la detección de anticuerpos dirigidos específicamente contra los LPS de cepa lisa (Kim Ji-Yeon et al., 2014).

La cadena O inmunodominante de LPS de *B. abortus* contienen determinantes antigénicas detectables por medio de las pruebas serológicas para brucelosis y es la causa principal de las reacciones cruzadas entre bacterias (Godfroid et al., 2002), debido a que otras bacterias presentan una conformación idéntica de esos LPS, se producen reacciones cruzadas falsas positivas en las pruebas serológicas (Kim Ji-Yeon et al., 2014). La principal causa de reacción cruzada en las pruebas de diagnóstico de rutina es *Yersinia enterocolítica* O: 9 la cual también es un cocobacilo gram negativo que se

puede encontrar de forma natural en alimento y agua. Solo la reacción cruzada con la cepa O: 9 es de relevancia en el uso de pruebas serológicas de rutina y aunque *Yersinia* presenta menores implicaciones clínicas y patológicas, puede contribuir de manera importante en el número de reacciones positivas a las pruebas realizadas (Acha N., 2001; Mainar-Jaime et al., 2005).

Métodos directos

Estos se fundamentan en la identificación de *Brucella* o sus componentes en tejidos de los animales. El aislamiento o cultivo bacteriológico es considerado la prueba de oro (OIE, 2012; Gwida et al., 2010). La tinción con colorantes específicos es otra opción en cuanto a métodos directos se refiere, ya que *Brucella* es una bacteria gram negativa y no muestra tinciones bipolares, aunque no es un organismo ácido resistente, muestra resistencia a la decoloración por ácidos débiles, por lo que se tiñe de rojo por el método de Stamps modificado del método de Ziehl- Neelsen.

Este es el procedimiento para el examen de frotis de órganos o fluidos biológicos previamente fijados por calor o etanol, con esta tinción, *Brucella* se tiñe de rojo sobre un fondo azul, sin embargo este método presenta baja sensibilidad en productos lácteos donde *Brucella* se encuentra en pequeñas cantidades, así mismo otros organismos que causan abortos como *Chlamydophila abortus* o *Coxiella burnetii* son difíciles de diferenciar de los organismos *Brucella* (OIE, 2012).

Métodos indirectos

Pruebas serológicas

Ninguna prueba serológica es considerada 100% efectiva en el diagnóstico de enfermedades (Godfroid et al., 2002). Es por ello que hay una amplia variedad de pruebas serológicas con características diferentes, y que pueden ser aplicadas según la situación epidemiológica.

La prueba de tarjeta con Rosa de Bengala (RB) al 8% consta de un antígeno amortiguado que se utiliza para detectar anticuerpos IgM e IgG contra cepas lisas de *Brucella*. Puede ser utilizado como prueba tamiz en bovinos además de ser un procedimiento cualitativo y rápido con una sensibilidad (Sen) entre 21 y 98.3% y Especificidad (Esp) que va desde 68.8 a 100% (OIE, 2012; Nielsen, 2002).

También se utiliza la prueba de precipitación con Rivanol (RIV), la cual detecta en su mayoría anticuerpos específicos IgG contra cepas lisas de *Brucella*, su realización se sugiere como prueba confirmatoria para efectos de campaña y se aplica en sueros de bovinos que previamente resultaron positivos a la prueba de tarjeta; por lo que se considera una prueba complementaria cuantitativa con una Sen que va de 50.5 a 100% y Esp de 21.9 a 100% (Nielsen, 2002; Padilla et al., 2010).

Una de las pruebas serológicas de diagnóstico que se encuentra entre los niveles más altos de Sen con 99 a 99.3% y Esp 96.9 a 100% es Fluorescencia Polarizada (FP) (Nielsen, 2002), esta prueba se basa en el principio de que las moléculas rotan a determinada velocidad cuando se

encuentran en solución, las moléculas pequeñas rotan a velocidades mayores que las moléculas de mayor tamaño. Si una molécula es etiquetada con un fluorocromo, el tiempo de rotación en un ángulo de 68.5° puede ser determinado midiendo la intensidad de luz polarizada en un plano vertical y horizontal, una molécula de mayor tamaño emite mayor luz polarizada en un plano simple, una molécula de menor tamaño rotando a más velocidad emite más luz despolarizada (OIE, 2012). Una de las características más sobresalientes de la prueba FP es que logra distinguir animales infectados con *Brucella* de aquellos vacunados con cepa 19 en el 90% de los casos, convirtiéndola en una prueba muy confiable, además de ser sumamente sencilla de realizar, lo cual la hace una prueba ideal para ser implementada en condiciones de campo (Nielsen et al., 2002), además que es considerada por la OIE (2012) como prueba aprobada para el comercio internacional de ganado.

Los procedimientos ELISA indirectos también ofrecen niveles de sensibilidad y especificidad cercanos al 100%. Nielsen (2002) reporta valores de Sen entre 92.5 y 100% y Esp 90.6 a 100%; además de diferenciar entre animales vacunados con la cepa RB51. El principio del ELISA indirecto se basa en la unión de anticuerpos desarrollados como consecuencia de estimulación de la respuesta inmune humoral contra uno o varios antígenos representativos de un agente patógeno. Aunque no son pruebas prácticas para aplicarse en campo, pueden realizarse en grandes números de muestras en laboratorios adaptados para tal fin. También es una prueba aprobada para el comercio internacional de animales o subproductos según la OIE (2012).

Otras pruebas

La prueba Fijación del complemento es utilizada como procedimiento de referencia para el comercio internacional de ganado y subproductos según lo indica la OIE (2012). Técnicamente representa un desafío, debido a la complejidad de su procedimiento; brevemente, las células de *Brucella abortus* son utilizadas como antígeno de prueba y son incubadas con diferentes diluciones de suero tratado a 55 °C para inactivar las proteínas del sistema complemento nativo y una fuente de complemento titulado generalmente de cobayo (hemolisina). Después de un período de incubación, una cantidad definida de eritrocitos de borrego recubiertos con anticuerpo de conejo es agregada. Si el complejo inmune primario se formó, el complemento será activado por lo tanto no está disponible para reaccionar con el complejo inmune secundario (eritrocitos + anticuerpo de conejo) dando como resultado una lisis muy ligera o la no presencia de lisis. Alternativamente si no se formó el complejo inmune primario el complemento lisará a los eritrocitos de bovino. La cantidad de hemolisina en solución es medida por la actividad de anticuerpos anti *Brucella* (Nielsen and Yu, 2010). La prueba de fijación de complemento detecta anticuerpos IgG (Castro et al., 2005), posee una Sen muy variable que va desde 23 a 97.1% con Esp de 30.6 a 100% (Nielsen, 2002). En México es utilizada como prueba oficial en las campañas de control y erradicación de la brucelosis bovina (NOM-041-ZOO-1995).

La Inmuno difusión radial (IDR) es una prueba que utiliza el hápteno nativo (HN) como antígeno el cual se incluye en un gel de agarosa al que se le

perforan unos pocillos donde se colocan las muestras de suero. Si el suero contiene anticuerpos contra el HN se desarrolla un anillo de precipitación alrededor del pozo después de 2 a 6 horas. Los resultados se reportan como positivos cuando una muestra presenta el anillo de precipitación y negativa cuando no se observa la banda de precipitación. Esta prueba presenta un 90.6% sen y Esp del 90% (Gall and Nielsen, 2004).

La prueba del anillo en leche utiliza como antígeno *Brucella abortus* cepa S99 teñida con hematoxilina, las inmunoglobulinas se unen a los glóbulos por la fracción constante (Fc). Si existen anticuerpos contra *Brucella* presentes en la leche, el antígeno se une a ellos resultando en una banda purpura en la capa de crema. Esta prueba se realiza en una muestra de leche del tanque. La formación de un anillo azul oscuro sobre la muestra de leche se considera como positivo y su ausencia se reporta como negativo (Nielsen et al., 2010). La Sen de esta prueba es de 88.5% con una Esp de 77.4% (Godfroid et al., 2010). Los resultados pueden verse alterados si la leche se encuentra en condiciones anormales, como en infecciones con otras bacterias, tal es el caso de la presencia de mastitis.

La Brucelina, también conocida como “prueba cutánea de *Brucella*” es una prueba sencilla, donde se depositan vía intradérmica 0.1 ml de alérgeno *Brucella mellitensis* B115 de cepa rugosa. Si un animal no vacunado desarrolla una reacción de hipersensibilidad entre las 48 a 72 horas, significa que los linfocitos T reconocieron el antígeno y se acumularon en el sitio de inoculación.

La Inflamación y engrosamiento local de la piel de 1.5 - 2 mm se considera como positiva a *Brucella* con una Sen de 78 a 93% y Esp 99.8% (Godfroid et al., 2010; OIE, 2012).

Cuadro 2. Sensibilidad y Especificidad de las pruebas diagnósticas

Prueba	Sensibilidad %	Especificidad%	Referencia
RB	21 - 98.3	68.8 - 100	Nielsen, 2002
RIV	50.5 - 100	21.9 - 100	Nielsen, 2002
FC	23 - 97.1	30.6 - 100	Nielsen, 2002
IELISA	92.5 - 100	90.6 - 100	Nielsen, 2002
FP	99 - 99.3	96.9 - 100	Nielsen, 2002
IDR	90.6	90	Gall and Nielsen, 2004
PAL	88.5	77.4	Godfroid et al, 2010
B	78 - 93	99.8	Godfroid et al, 2010

RB: Rosa de Bengala, RIV: Rivanol, FC: Fijación de Complemento, IELISA: Estudio Inmunoenzimático Indirecto, FP: Fluorescencia Polarizada, IDR: Inmunodifusión Radial, PAL: Prueba de Anillo en Leche, B: Brucelina (Prueba Cutánea *Brucella*).

Las pruebas de diagnóstico se aplican con el propósito de establecer un diagnóstico confirmatorio, para realizar estudios de prevalencia, con fines de certificación y en países en los que se ha erradicado la enfermedad, para la vigilancia epidemiológica con el fin de evitar la reintroducción de la brucelosis (Gall and Nielsen, 2004; Godfroid et al., 2010).

Múltiples estudios basados en comparaciones de distintas técnicas serológicas como ELISA, las pruebas de Rosa de Bengala y Rivanol para el

diagnóstico de brucelosis bovina han demostrado que los sistemas ELISA producen mejores niveles de sensibilidad y especificidad. Los sistemas ELISA utilizan los mismos antígenos derivados de LPS inmunodominantes de cepas lisas de *Brucella*, los cuales son compartidos por la mayoría de los miembros del género. En la práctica, se pueden emplear sistemas ELISA directos e indirectos. En el ELISA indirecto, es posible detectar la presencia de anticuerpos dirigidos contra los LPS de *Brucella* de cepa lisa. En el ELISA directo, anticuerpos monoclonales capturan antígenos circulantes de *Brucella* y es considerado como un método de diagnóstico definitivo. La aplicación de esta tecnología como prueba de diagnóstico básico en los programas de control y erradicación de la brucelosis bovina, ayudaría a generar indicadores de incidencia y prevalencia más confiables para la enfermedad (OIE, 2012; Godfroid et al., 2010).

Terapia antimicrobiana

No existe un tratamiento eficaz para la erradicación de la brucelosis; generalmente, se utiliza una combinación de antibióticos que consta de rifampicina, doxiciclina, ciprofloxacino y aminoglicosidos (Seleem et al., 2010). La tetraciclina y estreptomycin son ampliamente utilizadas con buenos resultados (Nicoletti, 2010) aunque deben utilizarse por períodos prolongados y el porcentaje de animales que recaen después del tratamiento es de 5-10% (Roop et al., 2004).

Prevención y Control

En el caso de la brucelosis bovina, es sumamente importante considerar la aplicación de medidas preventivas básicas como la selección de remplazos provenientes de hatos libres de *Brucella*, pruebas de diagnóstico previas a la compra de un lote nuevo de ganado son necesarias a excepción de remplazos provenientes de un área geográfica certificada libre de la enfermedad (Moreno, 2014). Además, es importante someter a los reemplazos a un período de cuarentena y aplicar pruebas serológicas, evitar el contacto con ganado o personas de quienes se desconozca su estado sanitario. Es muy importante contar con la asistencia de un laboratorio certificado para diagnosticar las causas de abortos, nacimientos prematuros u otros signos clínicos asociados a *Brucella*. Los animales sospechosos deben aislarse hasta que se realice el diagnóstico apropiado. Todo hato debe incluirse en las medidas de vigilancia como prueba del anillo de leche al menos 4 veces por año, realizar pruebas con procedimientos serológicos tales como Rosa de Bengala, Fijación de Complemento o iELISA (Moreno, 2014). Es necesario observar la apropiada disposición de placentas y fetos no viables y la desinfección completa de áreas contaminadas (Corbel, 2006).

La vacunación se recomienda con la cepa 19 ya que es de bajo costo y debe aplicarse en animales de 3 - 8 meses de edad. Para evitar entorpecer el diagnóstico serológico utilizado en programas y campañas oficiales se utiliza la vacuna que contiene la cepa RB51 la cual no causa reacciones cruzadas con las pruebas serológicas oficiales (Acha, 2001).

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación

El estudio se realizó en la ciudad de Mexicali, Baja California, México durante el período comprendido entre enero y noviembre del 2014.

Los trabajos de laboratorio se realizaron en las instalaciones y laboratorios del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias (IICV) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC).

Unidades experimentales

Las unidades de experimentación fueron bovinos de raza Holstein, hembras en producción con al menos una gestación a término y sin antecedentes de vacunación con las preparaciones que contienen cepas RB51 o 19 de *Brucella abortus*. Se colectaron un total de 377 muestras de sangre de animales en producción provenientes de tres unidades de producción lechera comercial. Del Municipio de Tijuana se obtuvieron 165 muestras, del Municipio de Mexicali se tomaron 178 y 34 provenientes de dos unidades de producción. De la unidad de producción de Tijuana se reportaron casos de brucelosis bovina mientras que las unidades de producción de Mexicali se encontraban certificadas como hato libre de brucelosis bovina establecido por la SAGARPA, con base en los lineamientos de la norma oficial mexicana NOM-041-ZOO-1995.

Procedimientos

Para efectos de este trabajo, se utilizó Fluorescencia Polarizada como prueba de referencia, considerándose como positivas todas aquellas muestras con un resultado mayor o igual a 105 unidades de mili polarización (mP).

Recolección y procesamiento de las muestras

Las muestras de sangre fueron colectadas por punción de la vena coccígea con agujas calibre 20 y tubos evacuados sin anticoagulante, posteriormente se rotularon con el número de arete de cada animal. Para la obtención del suero, las muestras de sangre se dejaron en reposo por 2 horas a temperatura ambiente hasta que se formó el coágulo. El suero se obtuvo centrifugando las muestras a 3000 x *g* durante 10 minutos. El suero obtenido fue homogenizado y separado en tres alícuotas de 1.5 ml cada una. Las muestras de suero fueron almacenadas en congelación a - 20 °C hasta el momento de las pruebas de laboratorio.

Pruebas de laboratorio

Las muestras se analizaron en el laboratorio de Brucelosis y Tuberculosis de la Unidad de Laboratorio del Diagnóstico ubicada en el Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California.

Rosa de Bengala

Se realizó la prueba Rosa de Bengala al 8% tal y como la describe Alton (1988). El antígeno fue producido por la Productora Nacional De Biológicos Veterinarios (PRONABIVE), dependiente de la SAGARPA. Brevemente, se depositaron 30 µl de suero problema sobre cada cuadrante de la lámina de vidrio de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo, posteriormente se depositaron 30 µl de antígeno y se mezcló el suero y el antígeno formando una zona circular de aproximadamente 2 cm de diámetro, se levantó la placa y realizaron movimientos rotatorios (10-20 por min). Transcurridos 4 minutos se procedió a la lectura utilizando un aglutinoscopio. El resultado se emitió como positivo o negativo. Las reacciones positivas presentan grumos de aglutinación y las negativas ausencia de estos (NOM-041-ZOO-1995; OIE, 2012).

Rivanol

Se realizó la prueba Rivanol según la NOM-041-ZOO-1995. Se depositaron 0.4 ml de suero problema y 0.4 ml de solución Rivanol, mezclando el tubo e incubando a temperatura ambiente por al menos 10 min. Los tubos fueron luego centrifugados a 1000 x g durante 5-10 min. Con pipeta serológica de Bang se aspiró el líquido sobrenadante y se realizó una prueba de aglutinación en una placa de vidrio depositando las cantidades de 0.08, 0.04, 0.02 y 0.01 ml. Se agregó 0.03 ml de antígeno Rivanol a cada cantidad de líquido sobrenadante, se mezclaron con un palillo comenzando con la cantidad más pequeña 0.01 ml, cada dilución fue extendida de forma que cubriera la

superficie indicada para la prueba estándar de aglutinación en placa (18, 21, 24, 27 mm respectivamente). Se inclinó la placa con movimientos rotatorios. Transcurridos 6 minutos se giró 4 veces la placa y se efectuó la lectura en el aglutinoscopio. Para facilitar las lecturas la comparación con los resultados en otras pruebas se utilizó la denominación a las diluciones obtenidas como 1:25, 1:50, 1:100, y 1:200 respectivamente. El resultado se expresa en función de la dilución más alta en la que se observa aglutinación.

Inmuno Difusión Radial con Hápteno Nativo (IDRHN)

Las pruebas de Inmuno Difusión Radial con Hápteno Nativo (IDRHN) se realizaron en las instalaciones del INIFAP-CENID-SAGARPA, México D.F., siguiendo el procedimiento indicado por Díaz (2000), utilizando las soluciones amortiguador de glicina pH de 7.8, solución de agarosa y solución stock HN. Se perforaron pocillos en el gel y se procedió a agregar 10µl de suero, se incubaron las placas en un recipiente cerrado a temperatura ambiente durante 24 horas y se procedió a la lectura sobre fondo con luz. Se reportaron resultados positivos cuando una muestra presentara un halo o anillo de precipitación alrededor del pozo y un resultado negativo cuando no se observó halo o anillo de precipitación (Díaz et al., 2000).

Inmunoensayo indirecto (IELISA)

Las pruebas a partir del sistema ELISA indirecto se desarrollaron siguiendo las instrucciones del fabricante. Los reactivos y protocolos del *Universal indirect enzyme immunoassay for detection of serum antibody to rough Brucella*,

catálogo 650112-5, fueron amablemente donados por *Harbin Peace River Biotechnology Company Limited*, Harbin, Heilongjian, China. Brevemente, se realizó la sensibilización del pocillo con el antígeno, se agregó la muestra problema, se realizó el lavado del pocillo para eliminar el exceso de antígeno o anticuerpo no unido, se agregó el anticuerpo secundario marcado con la enzima, se realizó el lavado del pocillo para eliminar el exceso de enzima no unida, se agregó el substrato enzimático y la solución stop. Para la lectura de la densidad óptica (D.O.) se utilizó un lector de ELISA a una longitud de onda de 450 nanómetros (nm) y se calculó el punto de corte como positivo cuando una muestra obtenía una D.O. equivalente al 20% del promedio de la D.O. del suero control positivo, de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

Fluorescencia polarizada

Se desarrolló la prueba siguiendo las indicaciones del fabricante (Laboratorio Diachemix, *Brucella Antibody Test Kit Fluorescence Polarization Assay*, catálogo número B1001) y la NOM-041-ZOO-1995. El procedimiento inicia con la lectura de tres muestras control negativas y una muestra control positiva. Cada muestra se diluye en una solución tampón en tubo de borosilicato agitando durante 30 segundos y dejando reposar 2 minutos, posteriormente se realiza la lectura en el equipo FP obteniéndose la lectura blanco. A cada muestra se agrega el antígeno conjugado, se deja reposar 2 minutos, se realiza la lectura nuevamente en el equipo para obtener la interacción antígeno anticuerpo presente (OIE, 2012).

La interpretación de los resultados se obtiene de la resta entre la muestra y el promedio de los controles negativos, cuyos datos se expresan en unidades de mili polarización (mP). Los posibles resultados se indican en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Estatus según las unidades de mP para FP

Estatus	Unidades mP
Negativo	<94
Sospechoso	94 a 104
Positivo	≥ 105

Debido a los altos niveles de sensibilidad y especificidad, establecidos entre los rangos de 98.5% a 99.7% y 99.9% a 100% respectivamente (Nielsen and Gall., 2001), la fluorescencia polarizada fue utilizada como prueba de referencia en este estudio. Asimismo, se consideró toda muestra con resultado sospechoso, entre 94 y 104 mP como negativo.

Inoculación experimental con *Yersinia enterocolítica* O: 9

Una cepa de *Yersinia enterocolítica* subespecie *enterocolítica* O:9 (ATTC catálogo número 55075) fue reconstituída siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante empleando un tubo de 2 ml con caldo nutritivo estéril, del cual se inocularon 0.5 ml del lote original de *Yersinia* en 4 platos de de Petri con agar nutritivo. Se incubó a 37°C durante 48 horas y posteriormente

se agregaron 3 ml de caldo nutritivo a cada plato agitando para recuperar las bacterias. Posteriormente, 2 ml de caldo sobrenadante fueron inoculados en 500 ml de caldo nutritivo estéril, incubado a 37°C durante 48 horas sobre una placa giratoria.

Para establecer el número de unidades formadoras de colonia (UFC), se realizaron diluciones seriadas en platos de agar nutritivo y se estableció el número de colonias por mililitro (UFC/ml) logrando un total de 3.5×10^9 UFC/ml. La suspensión de bacterias fue centrifugada a $1\,500 \times g$ durante 15 minutos a temperatura ambiente, el sobrenadante eliminado y resuspendidas en 50 ml de caldo nutritivo estéril para lograr un título de 3.5×10^{10} UFC/ml.

Protocolo de inoculación:

Para obtener suero con anticuerpos específicos contra *Yersinia enterocolítica* subespecie *enterocolítica* 0:9, se inocularon 10 bovinos raza Holstein mayores de 6 meses de edad, de un hato certificado como libre de brucelosis, con 2.5 ml vía intramuscular en la tabla del cuello una vez por semana, durante cuatro semanas. El día de la primera inoculación, se tomaron muestras de sangre de cada uno de los diez animales para obtener el suero sanguíneo siguiendo el procedimiento ya descrito. Las muestras de suero provenientes de este lote de animales, fueron probadas por Rosa de Bengala, Rivanol, IELISA y Fluorescencia Polarizada.

Análisis estadístico

Se generaron los indicadores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo; se utilizó el estadístico Kappa para establecer el nivel de concordancia entre las distintas pruebas diagnósticas empleadas en este trabajo (Martin,1987) utilizando el programa estadístico SAS versión 9.3.

RESULTADOS

Se realizó un estudio serológico en bovinos lecheros de raza Holstein procedentes de los municipios de Mexicali y Tijuana Baja California, entre los meses enero y noviembre del 2014 . Se analizaron un total de 377 muestras de suero por medio de las pruebas Rosa de Bengala, Rivanol, Inmunodifusión Radial, ELISA indirecto y Fluorescencia Polarizada. Este grupo de muestras, fueron colectadas de un establo del municipio de Tijuana con presencia confirmada de brucelosis (n=165) a través de pruebas oficiales, así como de dos hatos certificados como libre de brucelosis (n=212) por la SAGARPA.

Adicionalmente, se obtuvieron 10 muestras de suero de animales procedentes de un establo certificado libre de brucelosis a quienes se les inocularon cultivos puros de *Yersinia enterocolítica* O:9 para estimular la respuesta inmune humoral contra esa bacteria y comparar el fenómeno de reacción cruzada con el resto de las pruebas incluídas en este trabajo.

Debido a los altos niveles de sensibilidad y especificidad reportados en la literatura (Nielsen and Gall., 2001; OIE, 2012), además de ser reconocida por organismos internacionales como prueba válida para el diagnóstico de brucelosis bovina (OIE, 2012), la Fluorescencia Polarizada fue considerada como prueba de referencia en las comparaciones con el resto de las pruebas serológicas incluídas en este estudio.

Para la prueba de Rosa de Bengala que se utiliza de forma rutinaria en las campañas zoonosanitarias en México, se obtuvieron un total de 150 muestras

con resultado positivo (39.79%) y 227 muestras con resultado negativo (60.21%); la prueba confirmatoria oficial con Rivanol se obtuvieron 163 muestras con resultado positivo (43.23%) y 214 con resultado negativo (56.76%); para la prueba de inmunodifusión radial con hapteno nativo 120 muestras resultaron positivas (31.83%) y 257 resultaron negativas (68.16%); para el sistema ELISA indirecto que utiliza antígeno de cepa rugosa de *Brucella spp.* se obtuvieron 164 muestras con resultado positivo (43.50%) y 213 con resultado negativo (56.49%) y para la prueba de Fluorescencia Polarizada se obtuvieron 183 muestras con resultado positivo (48.54%) y 194 con resultado negativo (51.45%) (Cuadro 4.).

Cuadro 4. Resultados positivos, negativos y porcentajes obtenidos para cada una de las pruebas serológicas

(n= 377)

	RB		RIV		IDR		IELISA®		FP	
	TOTAL	%	TOTAL	%	TOTAL	%	TOTAL	%	TOTAL	%
POS	150	39.79	163	43.23	120	31.83	164	43.5	183	48.54
NEG	227	60.21	214	56.76	257	68.16	213	56.49	194	51.45

RB= Rosa de Bengala, RIV= Rivanol, IDR= Inmuno Difusion Radial, IELISA=Inmunoensayo indirecto, FP= Fluorescencia Polarizada.

Utilizando como prueba de referencia los resultados obtenidos de la Fluorescencia Polarizada, la prueba de Rosa de Bengala obtuvo 80.87% de sensibilidad y 98.97% de especificidad; la prueba de Rivanol, 84.15% de sensibilidad y 95.36% de especificidad; la prueba de inmunodifusión radial con

hapteno nativo 65.03% de sensibilidad y 99.48% de especificidad y el ELISA indirecto que utiliza antígeno de cepa rugosa de *Brucella spp.* obtuvo 85.25% de sensibilidad y 95.88% de especificidad (Cuadro 5.). Asimismo, la prueba de Rosa de Bengala obtuvo un Valor Predictivo Positivo de 98.67% y Valor Predictivo Negativo de 84.58 %; la prueba de Rivanol, 94.48% de Valor Predictivo Positivo y 86.45% de Valor Predictivo Negativo; la prueba de inmunodifusión radial con hapteno nativo obtuvo 99.17% de Valor Predictivo Positivo y 75.10% de Valor Predictivo Negativo y finalmente el sistema ELISA indirecto que utiliza antígeno de cepa rugosa de *Brucella spp.* obtuvo 95.12% de Valor Predictivo Positivo y 87.32% de Valor Predictivo Negativo (Cuadro 5.).

Cuadro 5. Valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de las pruebas de diagnóstico serológico

Prueba	Sensibilidad (95% CI)	Especificidad (95% CI)	VPP (95% CI)	VPN (95% CI)
RB	80.87% (74.42-86.30%)	98.97% (96.32-99.85%)	98.67 % (95.26-99.80%)	84.58% (79.21-89.02%)
RIV	84.15% (78.04-89.12%)	95.36% (91.37-97.85%)	94.48% (89.77-97.44%)	86.45% (81.12-90.73%)
IDR	65.03% (57.64-71.91%)	99.48% (97.15-99.91%)	99.17% (95.43-99.86%)	75.10% (69.34-80.26%)
IELISA	85.25% (79.26-90.04%)	95.88% (92.03-98.20%)	95.12% (90.61-97.86%)	87.32% (82.09-91.48%)

VPP=Valor predictivo positivo, VPN=Valor predictivo negativo, RB=Rosa de bengala, RIV=Rivanol, IDR=Inmunodifusión radial, IELISA=Elisa indirecto antígeno rugoso

Al comparar los niveles de concordancia de los resultados de las pruebas serológicas empleando el coeficiente Kappa (Martin, 1987) y tomándolo como referencia la prueba de Fluorescencia Polarizada, la prueba de Rosa de Bengala obtuvo un coeficiente Kappa (K) de 80.25; la prueba de Rivanol obtuvo K de 79.76; la prueba de inmunodifusión radial con hapteno nativo obtuvo K de 65.15 y el sistema ELISA indirecto que utiliza antígeno de cepa rugosa de *Brucella spp.* obtuvo un K de 81.36 (Cuadro 6).

Cuadro 6. Coeficiente Kappa de las pruebas diagnósticas empleando la fluorescencia polarizada como prueba de referencia

Prueba	Coeficiente Kappa ⁽¹⁾
RB/FP	80.25
RIV/FP	79.76
IDR/FP	65.15
IELISA/FP	81.36

(1) Coeficiente Kappa (Martin, 1987)

Animales inoculados con *Yersinia enterocolitica* O:9

Un grupo de 10 bovinos Hosltein mayores 6 meses de edad, con resultado negativo a brucelosis por medio de las pruebas de Rosa de Bengala, Rivanol, ELISA indirecto que utiliza antígeno de cepa rugosa de *Brucella spp.* y Fluorescencia Polarizada; fueron inoculados con 3.5×10^{10} UFC a intervalos de

siete días por cuatro ocasiones hasta lograr que todos los animales mostraran títulos de anticuerpos lo suficientemente potentes para obtener un resultado positivo por reacción cruzada en la prueba de Rosa de Bengala.

Posteriormente a las muestras de suero obtenidas en la cuarta semana de tratamiento con *Yersinia enterocolítica* O:9, fueron probadas nuevamente con Rosa de Bengala, Rivanol, ELISA indirecto que utiliza antígeno de cepa rugosa de *Brucella spp.* y por Fluorescencia Polarizada.

La totalidad de las muestras obtenidas previamente a la inoculación con *Yersinia enterocolítica* O:9 obtuvieron un resultado negativo a las pruebas de de Rosa de Bengala, Rivanol, ELISA indirecto que utiliza antígeno de cepa rugosa de *Brucella spp.* y Fluorescencia Polarizada. Asimismo, al realizar las pruebas en las muestras obtenidas a la cuarta semana post-inoculación con la suspensión de *Yersinia*, la totalidad de las muestras resultaron positivas para Rosa de Bengala y Rivanol, mientras que para el sistema ELISA indirecto que utiliza antígeno de cepa rugosa de *Brucella spp.* solo uno (1/10) animal resultó positivo a esta prueba, mientras que para Fluorescencia Polarizada ocho (8/10) animales resultaron positivos a *Brucella* (Cuadro 7).

En el cuadro 8 se muestran los resultados del sistema ELISA que utiliza antígeno rugoso de *Brucella abortus* por grupos de densidad óptica y el punto de corte sugerido por el fabricante.

Cuadro 7. Resultados de las pruebas serológicas en sueros de animales inoculados con *Yersinia enterocolitica* O:9

Animal	Rosa de Bengala		Rivanol		ELISA		Fluorescencia Polarizada	
	Día 0	Sem 4	Día 0	Sem 4	Día 0	Sem 4	Día 0	Sem 4
1	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos
2	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos
3	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg
4	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos
5	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos
6	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos
7	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos
8	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos
9	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos
10	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg

Neg = Negativo, Pos = Positivo

Cuadro 8. Resultados del sistema ELISA que utiliza antígeno rugoso de *Brucella abortus* por grupos de densidad óptica

	Grupo 1 ⁽¹⁾	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
D. O. ⁽²⁾	0 – 0.250	0.251 – 0.500	0.501 – 0.750	> 0.751
No. casos	212 (56.23%)	23 (6.10%)	20 (5.31%)	122 (32.36%)
Acumulado	212 (56.23%)	235 (62.33%)	255 (67.64%)	377 (100%)

(1) Valor de corte sugerido por el fabricante D.O.= 0.250

(2) D.O. = Densidad óptica obtenida a 450 nm

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este trabajo se compararon los niveles de sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo y valor predictivo positivo en muestras de suero de bovinos lecheros de raza Holstein sin antecedentes de vacunación contra *Brucella abortus*, a partir de las pruebas serológicas de rutina para detección de animales brucelosos. Las pruebas serológicas de rutina incluídas en este proyecto fueron Rosa de Bengala, Rivanol, Inmunodifusión Radial con Hapteno Nativo, un sistema ELISA indirecto basado en un antígeno de lipopolisacárido de *Brucella spp* de cepa rugosa y la prueba de Fluorescencia Polarizada, esta última, fue considerada como prueba de referencia en este estudio. Con excepción del sistema ELISA indirecto que utiliza un antígeno de lipopolisacárido de *Brucella spp* de cepa rugosa, el resto de las pruebas serológicas utilizadas se fundamentan en la detección de anticuerpos dirigidos contra epítomos del lipopolisacárido de *Brucella abortus* de cepa lisa.

Tomando a la Fluorescencia Polarizada como prueba de referencia, la prueba con Rosa de Bengala logró una sensibilidad de 80.87%, valor que se encuentra dentro de los rangos reportados en otros estudios realizados en explotaciones de bovinos lecheros que habían resultado positivos a esta prueba (Gall and Nielsen, 2004). Asimismo, la prueba de Rosa de Bengala logró una especificidad de 98.97% en este estudio, muy por encima del 81.20% reportado por Gall y Nielsen (2004) al evaluar múltiples reportes publicados sobre los niveles de sensibilidad y especificidad para esta prueba en bovinos lecheros. El mejor desempeño de especificidad logrado por la prueba de Rosa de Bengala en el presente estudio puede deberse a la circunstancia que las muestras probadas provenían de explotaciones donde no se vacuna contra *Brucella*, lo cual disminuye la posibilidad de reacciones cruzadas por respuesta de anticuerpos contra antígenos vacunales (Erdenebaatar et al., 2004).

La prueba de Rivanol obtuvo un 84.15% sensibilidad, ligeramente por debajo del 89.15% reportado por Gall y Nielsen (2004) aunque destaca la especificidad de 95.36% lograda por las pruebas con Rivanol en nuestro

estudio, comparada con el 63.10% encontrado por Gall y Nielsen. Los altos niveles de especificidad logrados por la prueba de Rivanol ponen en evidencia la utilidad de esta prueba para eliminar reacciones inespecíficas con IgM principalmente (Nielsen, 2010) y confirmar el resultado positivo de brucelosis en animales que resultaron positivos a la prueba con Rosa de Bengala (Poester et al., 2013). Al igual que en los reportado para las pruebas con Rosa de Bengala, los altos niveles de especificidad obtenidos por la prueba con Rivanol pueden deberse a que los animales provenían de explotaciones donde no se vacuna contra *Brucella* y por lo tanto, la posibilidad de reacciones cruzadas como respuesta a las vacunación no interfirió con los resultados obtenidos (Erdenebaatar et al., 2004).

Finalmente el sistema ELISA indirecto basado en un antígeno de cepa rugosa de *Brucella spp* obtuvo 85.25% de sensibilidad, notablemente inferior al 94.8% reportado por Gall y Nielsen (2004), aunque el nivel de especificidad de 95.88% obtenida en nuestro trabajo es muy similar al 97.3% reportado por Gall y Nielsen (2004). Es importante señalar que la mayoría de los sistemas ELISA indirectos disponibles comercialmente, utilizan el lipopolisacárido completo de cepas lisas de *Brucella abortus* como antígeno de fase sólida y están enfocados hacia la detección de anticuerpos tipo IgG, lo cual proporciona alta sensibilidad para detectar animales positivos a *Brucella*, pero también los hace mas vulnerables a producir reacciones serológicas cruzadas falsas positivas con otros microorganismos, particularmente con *Yersinia enterocolítica* O:9 (Godfroid, 2010; Nielsen, 2010). En este trabajo, se utilizó un sistema ELISA indirecto que utiliza antígenos de lipopolisacáridos de cepas rugosas de *Brucella spp*, los cuales poseen una estructura antigénica distinta a los de otros microorganismos con alta homología antigénica en esa región, como es el caso de *Yersinia enterocolítica* O:9 (Erdenebaatar et al., 2004; Nielsen, 2010). Lo anterior, permitió la aplicación de un sistema de detección de anticuerpos dirigidos contra una región antigénica única para bacterias del género *Brucella* y es capaz de discriminar más del 90% de animales infectados con otros microorganismos que comparten dicha estructura (Erdenebaatar et al., 2004;

Mainar-Jaime, 2005; Nielsen, 2010). Lo anterior, fue confirmado probando sueros de bovinos inoculados experimentalmente con una suspensión de *Yersinia enterocolítica* O: 9, cuyas muestras de suero produjeron reacciones cruzadas falsas positivas al ser probadas con Rosa de Bengala, Rivanol y Fluorescencia Polarizada. Únicamente el sistema ELISA indirecto basado en un antígeno de cepa rugosa de *Brucella spp* logró diferenciar en 9 de 10 muestras la respuesta a los anticuerpos producidos como resultado de la inoculación con *Yersinia*.

Si bien el sistema ELISA indirecto basado en un antígeno de cepa rugosa de *Brucella spp* utilizado en este estudio es capaz de discriminar animales infectados con *Yersinia* y establecer un diagnóstico mas certero de infección por *Brucella*, su utilización todavía no es recomendable en nuestro medio, debido principalmente que las tasas de prevalencia de brucelosis en el ganado lechero de la región, son muy altas como para invertir en el costo de estos reactivos, sobre todo si se considera que la prueba con Rosa de Bengala y su par confirmatorio, la prueba de Rivanol, demostraron niveles de sensibilidad y especificidad suficientes para detectar la mayor cantidad de animales reactores positivos.

Con base en lo anterior, se concluye que las pruebas de rutina para diagnóstico serológico de brucelosis bovina disponibles en la actualidad, son suficientes para detectar animales infectados con *Brucella abortus* y que además, existe la disponibilidad de herramientas de escrutinio serológico con tecnología capaz de diferenciar animales brucelosos de aquellos infectados con organismos con alta homología y que no interfieren con el resultado de las pruebas serológicas. Se recomienda la exploración de alternativas de diagnóstico distintas a las que utilizan los lipopolisacáridos de la membrana bacteriana.

LITERATURA CITADA

- Acha N. Pédro. 2001. *Zoonoses and communicable diseases common to man and animals*. 2da edicion. Pan American Health Organization. Washington D.C. USA.
- Alton G.G., L. M. Jones, R.D. Angus, J.M. Verger. (1988). WHO. Laboratory techniques in brucellosis.
- Avila-Calderon E.D., Lopez-Merino A., Sriranganathan N., Boyle S.M., Contreras-Rodriguez A. (2013) A history of the development of Brucella vaccines. Biomed Res Int 2013;743509. DOI: 10.1155/2013/743509.
- Carvalho Neta A.V., Mol J.P., Xavier M.N., Paixao T.A., Lage A.P., Santos R.L. (2010) Pathogenesis of bovine brucellosis. Vet J 184:146-55. DOI: S1090-0233(09)00151-8 [pii] 10.1016/j.tvjl.2009.04.010.
- Carvalho Neta A.V., Stynen A.P., Paixao T.A., Miranda K.L., Silva F.L., Roux C.M., Tsolis R.M., Everts R.E., Lewin H.A., Adams L.G., Carvalho A.F., Lage A.P., Santos R.L. (2008) Modulation of the bovine trophoblastic innate immune response by Brucella abortus. Infect Immun 76:1897-907. DOI: IAI.01554-07 [pii]10.1128/IAI.01554-07.
- Castro Hugo Abel, Sofía Raquel González, María Inés Prat, 2005. Brucelosis una revisión práctica.
- Chenais E., Bagge E., Lambertz S.T., Artursson K. (2012) Yersinia enterocolitica serotype O:9 cultured from Swedish sheep showing serologically false-positive reactions for Brucella melitensis. Infect Ecol Epidemiol 2. DOI: 10.3402/iee.v2i0.19027 19027 [pii].
- Cloeckaert Axel , Vincent Weynants, Jacques Godfroid, Jean-Michel Verger, Maggy Grayon, and Michel S. Zygmunt, 1998. O-Polysaccharide Epitopic Heterogeneity at the Surface of Brucella spp. Studied by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Flow Cytometry, Clin. Diagn. Lab. Immunol.
- Conde A. Raquel Alvarez, Vilma Arce Gorvel, Maite Iriarte, Mateja Mancĉek-Keber, Elías Barquero Calvo, Leyre Palacios Chaves, Carlos Chacón Díaz, Esteban Chaves Olarte, Anna Martirosyan, Kristine von Bargen, María Jesús Grilló, Roman Jerala, Klaus Brandenburg, Enrique Llobet, José A. Bengoechea, Edgardo Moreno, Ignacio Moriyón, Jean Pierre Gorvel, 2012. The Lipopolysaccharide Core of Brucella abortus Acts as a Shield against Innate Immunity Recognition.
- Corbel M.J., Brucellosis in Humans and Animals. Worl Health Organization. Albany, NY, USA. 2006.

- DGE (Dirección General de Epidemiología), InDRE, 2012, epidemiologia.salud.gob.mx. Zoonosis de gran importancia médica. (Biol. Juan Gabriel Valle Valdez, 2002)
- Díaz Aparicio Efrén, 2013, Epidemiología de la brucelosis causada por *Brucella mellitensis*, *Brucella suis* y *Brucella abortus* en animales domésticos.
- Díaz Aparicio Efrén, L. Hernández, G. Valero, B. Arellano y colaboradores, 2000. Diagnóstico de Brucelosis Animal.
- Erdenebaatar, J., Bayarsaikhan, B., Yondondorj, A., Watarai, M., Shirahata, T., Jargalsaikhan, E., Kawamoto, K., and Makino, S. (2004). Epidemiological and serological survey of brucellosis in Mongolia by ELISA using sarcosine extracts. *Microbiol Immunol* **48**(8), 571-7.
- Gall D. and K. Nielsen, 2004. Serological diagnosis of bovine brucellosis: a review of test performance and cost comparison.
- Godfroid J., Nielsen K., Saegerman C. (2010) Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. *Croat Med J* 51:296-305.
- Godfroid J., Cloeckaert A., Liautard J.P., Kohler S., Fretin D., Walravens K., Garin-Bastuji B., Letesson J.J. (2005) From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet Res* 36:313-26. DOI: 10.1051/vetres:2005003v4056 [pii].
- Godfroid J., Saegerman C., Wellemans V., Walravens K., Letesson J.J., Tibor A., Mc Millan A., Spencer S., Sanna M., Bakker D., Pouillot R., Garin-Bastuji B. (2002) How to substantiate eradication of bovine brucellosis when aspecific serological reactions occur in the course of brucellosis testing. *Vet Microbiol* 90:461-77. DOI: S0378113502002304 [pii].
- Gorvel Jean-Pierre, 2008. *Bucella* a Mr "Hide" converted into Dr Jekyll.
- Gorvel J.P., Moreno E. (2002) *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol* 90:281-97. DOI: S0378113502002146 [pii].
- Gwida M., Al Dahouk S., Melzer F., Rosler U., Neubauer H., Tomaso H. (2010) Brucellosis - regionally emerging zoonotic disease? *Croat Med J* 51:289-95.
- INIFAP- CENID- SAGARPA, Aguilar Romero Francisco (Dr.), Dr. Antonio Cantú Covarrubias, Dr. Efrén Díaz Aparicio, M.C., Lucía del Carmen Favila Humara, M.C. Enrique Herrera López, Dr. José Francisco Morales Álvarez, Dra. Erika Gabriela Palomares Resendiz, M.C. Marco Antonio Santillán Flores, Prevención de Brucelosis en rumiantes, Manual de capacitación, 2011.
- Kim Ji-Yeon , So-Ra Sung, Kichan Lee, Hyang-Keun Lee, Sung-Il Kang, Jin Ju Lee, Suk Chan Jung, Yong Ho Park, Moon Her, 2014. Immunoproteomics of *Brucella abortus* RB51 as candidate antigens in serological diagnosis of brucellosis.

- Luna Martínez J. Eduardo, Claudia Mejía Terán, 2002. Brucellosis in México: current status and trends.
- Mainar-Jaime Raúl C., Pilar M. Muñoz, María J. de Miguel, María J. Grilló, Clara M. Marín, Ignacio Moriyón, José M. Blasco, 2005. Specificity dependence between serological tests for diagnosing bovine brucellosis in *Brucella*-free farms showing false positive serological reactions due to *Yersinia enterocolitica* O:9.
- Martin S. W., A. H. Meek, P. Willeberg. (1987). Veterinary Epidemiology PRINCIPLES AND METHODS. Pag. 73-75.
- Martirosyan A., Moreno E., Gorvel J.P. (2011) An evolutionary strategy for a stealthy intracellular *Brucella* pathogen. Immunol Rev 240:211-34. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2010.00982.x.
- Moreno E. (2014) Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. Front Microbiol 5:213. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00213.
- Moreno Rosales José Francisco, Tomas Benjamín Rentería Evangelista, Roberto Searcy Bernal, Martin Francisco Montano Gómez, (2002). Seroprevalencia y factores de riesgo asociados a la brucelosis bovina en hatos lecheros de Tijuana, Baja California.
- Nicoletti P. (2010) Brucellosis: past, present and future. Prilozi 31:21-32.
- Nielsen K. (2002) Diagnosis of brucellosis by serology. Vet Microbiol 90:447-59. DOI: S0378113502002298 [pii].
- Nielsen, K. and D. Gall (2001). "Fluorescence polarization assay for the diagnosis of brucellosis: a review." J Immunoassay Immunochem 22(3): 183-201.
- Nielsen K., Gall D., Bermudez R., Renteria T., Moreno F., Corral A., Monroy O., Monge F., Smith P., Widdison J., Mardrueno M., Calderon N., Guerrero R., Tinoco R., Osuna J., Kelly W. (2002) Field trial of the brucellosis fluorescence polarization assay. J Immunoassay Immunochem 23:307-16. DOI: 10.1081/IAS-120013030.
- Nielsen K., Smith P, Conde S, Draghi de Benitez G, Gall D, Halbert G, Kenny K, Massengill C, Muenks Q, Rojas X, Perez B, Samartino L, Silva P, Tollersrud T, Jolley M. 2004. Rough lipopolysaccharide of *Brucella abortus* RB51 as a common antigen for serological detection of *B. ovis*, *B. canis*, and *B. abortus* RB51 exposure using indirect enzyme immunoassay and fluorescence polarization assay.
- Nielsen K., Yu W.L. (2010) Serological diagnosis of brucellosis. Prilozi 31:65-89.
- Norma Oficial Mexicana, NOM-041-ZOO-1995. Campaña nacional contra la brucelosis en los animales. Diario Oficial, 20 de agosto 1996.
- OIE. 2012. Terrestrial Manual, BOVINE BRUCELLOSIS.
- Oliveira S.C., de Almeida L.A., Carvalho N.B., Oliveira F.S., Lacerda T.L. (2012) Update on the role of innate immune receptors during *Brucella abortus*

- infection. Vet Immunol Immunopathol 148:129-35. DOI: S0165-2427(11)00197-8 [pii] 10.1016/j.vetimm.2011.05.036.
- Padilla Poester Fernando, Klaus Nielsen, Luis Ernesto Samartino and Wei Ling Yu, 2010. Diagnosis of Bucellosis.
- Poester F.P, L.E. Samartino and R.L.Santos. 2013. Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock.
- Roop R.M., 2nd, Bellaire B.H., Valderas M.W., Cardelli J.A. (2004) Adaptation of the Brucellae to their intracellular niche. Mol Microbiol 52:621-30. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2004.04017.x MMI4017 [pii].
- SAGARPA. INIA-CIANO. 2007. Guía para la asistencia técnica agrícola: área de influencia del CAEMEXI.ED.CAEMEXI, 2^{da} Ed. Mexicali, B.C. México.
- Seleem Mohamed N., Stephen m. Boyle, Nammalwar Sriranganathan, Brucellosis: a re-emerging zoonosis, 2010.
- Wang Zhen, Shuangshan Wang and Qingmin Wu. 2014. Cold shock protein A plays an important role in the stress adaptation and virulence of *Brucella mellitensis*.