

BRUCELOSIS - INTERPRETACIÓN DEL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

Tomado y adaptado del Boletín Técnico N° 2- Dr Boris Szyfres IICA/SENASA

1.- PAPEL DEL DIAGNÓSTICO Y DE LA ELIMINACIÓN DE REACCIONANTES EN EL PROGRAMA DE CONTROL

La base del Programa de Control y Erradicación de la Brucelosis Bovina es la siguiente:

- 1.- vacunación obligatoria del 100 % las terneras entre 3 y 8 meses de edad,
- 2.- diagnóstico serológico realizado a partir de muestras extraídas por el Veterinario Acreditado en Laboratorios de la Red habilitados por el SENASA para tal fin y
- 3.- eliminación de los animales positivos.

La vacuna *Brucella abortus* cepa 19 tiene un efecto antiabortivo considerable y confiere inmunidad de alto grado, pero no absoluta. La inmunidad que confiere puede ser vencida por una exposición masiva o por cepas de campo altamente virulentas. Es por ello que es conveniente además de vacunar reducir las fuentes de infección eliminando los animales reaccionantes.

2.- INFLUENCIA DE LA VACUNACIÓN SOBRE EL DIAGNÓSTICO

La vacunación tiene indudables ventajas pero también algunas desventajas. El inconveniente mayor es que la vacuna induce la formación de anticuerpos que pueden confundir el diagnóstico. Para contrarrestar este inconveniente es que se debe vacunar entre los 3 y 8 meses de edad. Cuanto más joven es el animal, menor tiempo retiene los anticuerpos debido a la vacunación. Las hembras vacunadas a los 3 meses se vuelven negativas dos meses después de la vacunación, en cambio las vacunadas a los 6 meses tardan en hacerlo 6 meses y las vacunadas a los 9 meses (fuera de la edad permitida) mantiene la clasificación de sospechosa 15 meses después de la vacunación. En términos generales se puede afirmar que el 95 % de las hembras vacunadas a los 3-8 meses se negativizan a la edad de 2 años.

Otro aspecto es la infección residual por la vacuna. La cepa 19 produce en general un proceso de infección de corta duración en los animales vacunados. Sin embargo en algunos animales se ha podido comprobar una infección duradera y persistente en el tejido mamario, con aislamiento de la cepa vacunal en leche. Estos animales no pueden distinguirse de los infectados por cepas a campo mediante pruebas serológicas. Afortunadamente la proporción de estos animales es muy baja 2-3 /100.000 terneras vacunadas.

3.- DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

Las pruebas serológicas dan una evidencia indirecta de la infección brucélica, que cuando son efectuadas en forma uniforme y se las interpreta con criterio epidemiológico constituyen el instrumento más práctico para el diagnóstico.

Para poder interpretar debidamente el resultado del diagnóstico es necesario conocer la dinámica de la evolución de los anticuerpos antibrucela, la evolución de las inmunoglobulinas específicas después de la infección con una cepa virulenta de campo así como después de la vacunación con la cepa 19.

4.- LAS INMUNOGLOBULINAS EN BRUCELOSIS

El término inmunoglobulinas comprende las proteínas que poseen actividad de anticuerpo. Las principales inmunoglobulinas (Ig) que nos conciernen en Brucelosis son la M y la G. Se reconocen en el bovino dos subclases de IgG: la IgG 1 y la IgG 2. La IgG 1 es la más abundante en el suero y secreciones lácteas mientras que la IgG 2 se encuentra en concentraciones mas bajas, pero puede aumentar en determinadas circunstancias. La IgA fue poco estudiada en Brucelosis.

4.1 PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LAS INMUNOGLOBULINAS

Las inmunoglobulinas IgM e IgG se diferencian entre otras características por su peso molecular, constante de sedimentación, estabilidad al calor, movilidad electroforética, resistencia al mercaptoetanol, precipitación por el rivanol que es un compuesto de la acridina e inhibición por pH bajo.

4.2 EVOLUCIÓN DE LAS INMUNOGLOBULINAS EN ANIMALES VACUNADOS E INFECTADOS.

La vacunación con la cepa 19 estimula la aparición de Ig M al cabo de unos 5-7 días y alcanzan su máxima concentración a las 2-3 semanas. Luego su concentración en el suero va reduciéndose pero sin desaparecer durante varios meses.

Las IgG aparecen casi al mismo tiempo, o algo más tarde, y alcanzan su máxima concentración de 28 a 42 días después de la vacunación. Estas inmunoglobulinas desaparecen más rápidamente que las IgM, perdurando unos 6 meses después de la vacunación de terneras jóvenes.

La infección natural o experimental con cepas de *Brucella abortus* virulentas va seguida de la formación de IgM e IgG, pero la concentración de Ig M declina, mientras que la IgG tiende a persistir todo el tiempo que el animal está infectado.

En animales con Brucelosis crónica la IgG es la inmunoglobulina principal y a veces la única detectable. En consecuencia, la diferencia principal entre animales vacunados e infectados es la perdurabilidad de la IgG en estos últimos.

an las pruebas del 2 mercaptoetanol, Rivanol, Fijación de Com En el conocimiento de estos hechos inmunológicos se basamento y otras.

4.3 PRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA RELACIÓN DE LA EDAD DE VACUNACIÓN Y EL NIVEL Y PERSISTENCIA DE IGG.

La vacunación de terneras con cepa 19 es obligatoria para todos los rodeos del país. En los rodeos donde se está en proceso de erradicar la infección o ya fue erradicada, interesa evitar al máximo la interferencia que puedan tener los anticuerpos originados por la vacunación con el diagnóstico de la enfermedad.

Anteriormente se expresó que cuanto más joven es el animal al vacunar tanto más rápidamente desaparecen los anticuerpos post vacunales.

Veamos la relación del tenor y persistencia de los anticuerpos IgM e IgG en relación a la edad de vacunación. Las figuras 1 y 2 muestran gráficamente la diferencia en el aspecto mencionado, cuando se vacunan terneras de 4 a 6 meses ó de 8 meses de edad.

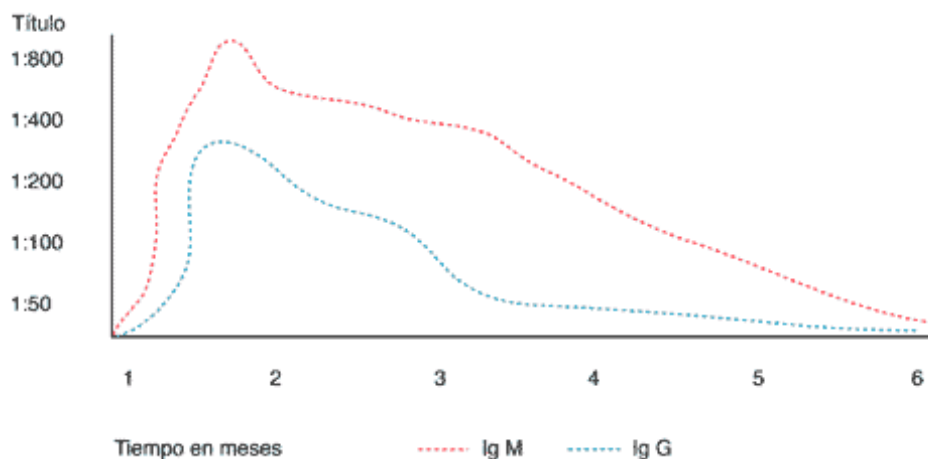


Figura 1.- Representación esquemática de los resultados de la prueba de aglutinación con sueros de terneras vacunadas con cepa 19 entre 4 y 6 meses de edad.

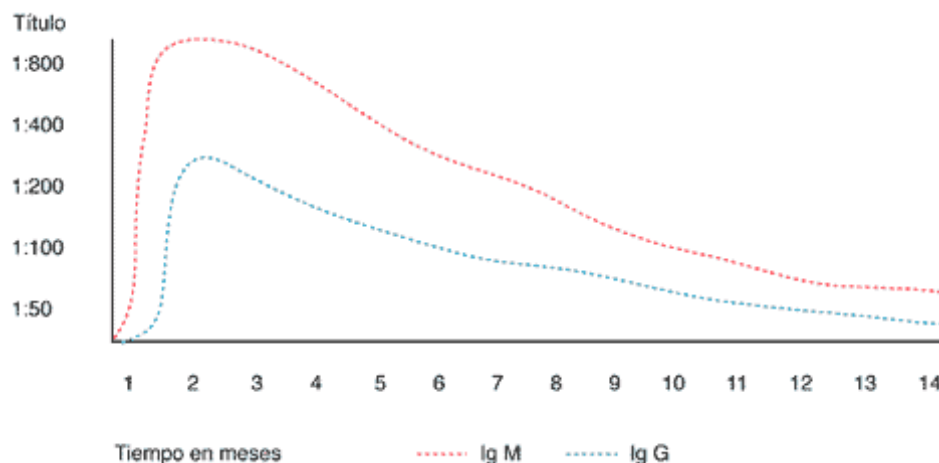


Figura 2.- Representación esquemática de los resultados de la prueba de aglutinación con sueros de terneras vacunadas con la vacuna cepa 19 a los 8 meses de edad.

Según se puede observar, los anticuerpos a títulos significativos no solo desaparecen más rápidamente en terneras vacunadas entre 4 y 6 meses de edad, sino que el nivel de la IgG es mucho menor y menos persistente que cuando se vacunan animales a los 8 meses y con más razón a mayor edad. Vacunando a edad temprana no solamente se reduce el riesgo de títulos persistentes a la prueba de seroaglutinación, sino también a las pruebas complementarias. De ahí la recomendación de vacunar a temprana edad en los establecimientos donde se está erradicando la brucelosis.

4.4 PAUTAS DE IG M E IG G EN ANIMALES INFECTADOS NO VACUNADOS Y VACUNADOS.

Cuando un animal es infectado natural o experimentalmente, aparecen primero los anticuerpos Ig M y al poco tiempo las IgG. En la figura 3 vemos un ejemplo de una vaquillona no vacunada y expuesta a una cepa virulenta que reaccionó primero a la seroaglutinación debido a anticuerpos de la clase IgM, ya que los de la clase IgG no se habían formado todavía. Durante el curso de la infección empezaron a predominar las inmunoglobulinas G y mantuvieron un nivel más alto que las IgM. Si bien esta figura representa solo un animal y las pautas de la seroaglutinación pueden variar en diferentes individuos, de acuerdo a la dosis de exposición y vía de inoculación, el ejemplo ilustra bien que las inmunoglobulinas M se forman como una respuesta específica y son importantes para el diagnóstico, especialmente al principio de la infección.

Cuando una hembra vacunada se infecta por una cepa virulenta, los anticuerpos IgG reaparecen más pronto debido a la memoria inmunológica.

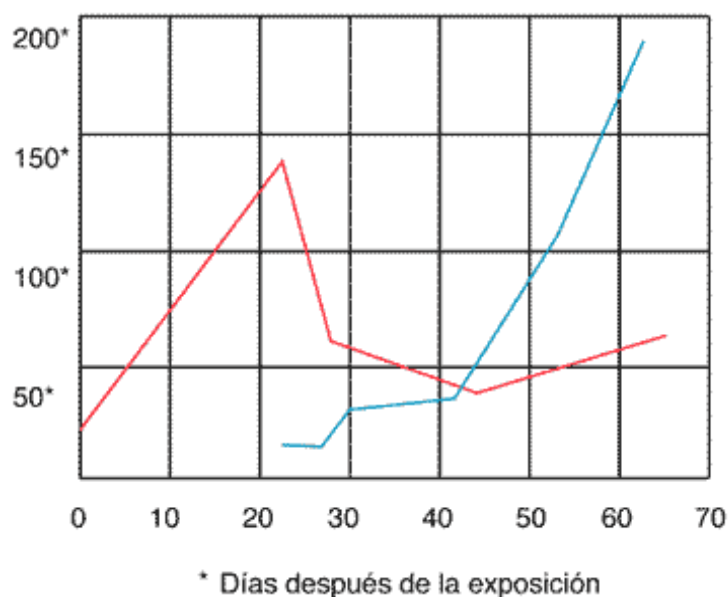


Figura 3.- Desarrollo secuencial de IgM y de IgG en una vaquillona, sin antecedentes de vacunación, expuesta a una cepa virulenta de *Brucella abortus*.

5.- EL USO DE LAS DIFERENTES PRUEBAS SEROLÓGICAS

Las pruebas serológicas se han clasificado según el uso que se les da en diferentes países en:

- 1.- Pruebas de rutina
- 2.- Pruebas complementarias
- 3.- Pruebas de vigilancia epidemiológica y
- 4.- Pruebas tamiz o de screening

Una misma prueba puede servir en un programa de prueba operativa y ser definitiva para el diagnóstico o ser la prueba tamiz o complementaria en otro programa. Esta diversidad de aplicaciones de una prueba u otra depende grandemente de la situación epidemiológica de la región o país, de la cobertura vacunal de las terneras y de la infraestructura de los servicios veterinarios especialmente la disponibilidad y calidad de los laboratorios de diagnóstico.

La eficacia de una prueba diagnóstica depende de su sensibilidad y de su especificidad, valores que miden la proporción de falsos negativos y de falsos positivos respectivamente.

5.1 SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LAS PRUEBAS

Entendemos por sensibilidad de una prueba el grado de capacidad que tiene para detectar animales infectados por el agente específico, en nuestro caso Brucella. De esta manera, si la prueba que usamos da reacciones positivas en 98 animales de 100 bovinos infectados diremos que la prueba tiene 98 % de sensibilidad. El 2 % restante son "falsos negativos". En un programa de erradicación interesa mucho que la prueba empleada sea lo suficientemente sensible para que el grado de error por "falsos negativos" sea el menor posible, ya que el objetivo es eliminar todo foco de infección de un rodeo.

Ninguna prueba es capaz de descubrir el 100 % de los bovinos infectados de todos los rodeos. Por especificidad en cambio medimos el grado de capacidad de la prueba de detectar el mayor número de infecciones específicas y el menor número de "falsos positivos". Una prueba altamente específica será la que de menos reacciones de "falsos positivos". Si de 100 animales no infectados, la prueba da reacciones positivas en 5 animales, decimos que la misma tiene una especificidad del 95%. Una prueba poco específica es causa por consiguiente del sacrificio de animales sanos y de pérdidas económicas innecesarias. Ninguna prueba serológica sin embargo es 100 % específica. Si nosotros quisiéramos dar a una prueba mayor sensibilidad, disminuiría a la vez la especificidad.

6.- LAS PRUEBAS DE SEROAGLUTINACIÓN

Estas pruebas fueron y son ampliamente usadas para el diagnóstico de la brucelosis. Sin embargo cuando la proporción de rodeos infectados y la prevalencia global de la infección llegan a tasas reducidas, aparecen junto con las limitaciones de las pruebas los rodeos problema en los cuales hay que recurrir a otras pruebas para poder erradicar la enfermedad. En las pruebas de seroaglutinación predominan la reacción con las IgM. Las IgG 1 e IgG 2 difieren en su actividad. La IgG 1 tiene poco poder aglutinante, mientras que la Ig 2 es activa en la prueba.

6.1.- LOS "FALSOS POSITIVOS"

Los "falsos positivos" en las reacciones se deben a varias causas, tales como anticuerpos residuales por la vacunación con cepa 19 y reacciones cruzadas debidas a anticuerpos originados por bacterias que tienen lipopolisacáridos superficiales similares a los de Brucella. Ya se dijo que hay una pequeña proporción de animales especialmente los vacunados a una edad tardía que puede mantener anticuerpos aglutinantes que persisten durante mucho tiempo. Las reacciones en estos casos se deben a la inmunoglobulina M, ya que la IgG 2 generalmente desaparece rápidamente y la IgG 1 es poca activa en la prueba y además su concentración se reduce al poco tiempo después de la vacunación.

El origen de muchas reacciones inespecíficas del bovino no se conoce. Sin embargo se sabe que algunas salmonellas dan reacciones cruzadas. Se ha comprobado que hay una relación antigénica entre Brucella y Escherichia coli y con Yersinia enterocolitica.

6.2.- LOS "FALSOS NEGATIVOS"

Los "falsos negativos" en las pruebas de aglutinación se presentan durante el período de incubación es decir desde la exposición a la infección hasta la aparición de la aglutininas. En hembras expuestas por primera vez a la infección durante la gestación es frecuente que las aglutininas aparezcan varios días a dos semanas después del aborto o del parto. Además hay animales infectados que nunca alcanzan un título aglutinante significativo. De especial interés son

algunos animales con infección crónica, que se encuentran en los llamados "rodeos problema" y en los cuales las IgMhan bajado a un nivel no diagnóstico y casi todos los anticuerpos están constituídos por IgG.

Estos animales pueden ser reconocidos por las pruebas complementarias. La figura 4 ilustra los resultados de seroaglutinación de algunas vacas de "rodeos problema".

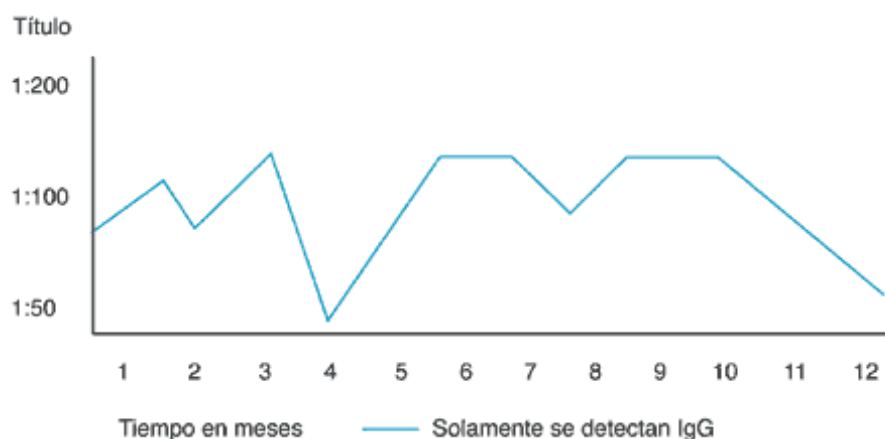


Figura 4.- Representación esquemática de los resultados de la prueba de seroaglutinación de algunas vacas infectadas de "rodeos problema".

6.3 PROCEDIMIENTOS A SEGUIR CON HEMBRAS Y MACHOS DE REACCIÓN SOSPECHOSA

Los animales sospechosos a la prueba de aglutinación deben ser examinados en la próxima prueba general del rodeo, o si es posible antes, con el fin de clarificar su estado frente a la infección sobre la base del aumento, estabilidad o reducción del título. Si el título se incrementa es indicación que el animal está enfermo; si disminuye, se le otorga la clasificación de negativo. Más difícil es decidir sobre los animales con títulos estables del rango de sospechoso, que deberán ser eliminados o sometidos a pruebas complementarias. En toros con títulos bajos es conveniente además de las pruebas complementarias recurrir a la prueba de aglutinación en plasma seminal ya que a veces se comprueban títulos más altos en semen que en suero.

7.- ASPECTOS IMPORTANTES EN EL DIAGNÓSTICO

7.1 EL PERÍODO DE INCUBACIÓN EN LA BRUCELOSIS BOVINA

Uno de los grandes problemas en la lucha contra la brucelosis es el período prolongado y variable de incubación. El diagnóstico serológico se basa en la detección de anticuerpos humorales. Bajo las condiciones naturales de campo el intervalo entre la exposición a la infección y la aparición de anticuerpos varía ampliamente.

La experiencia ha demostrado que los principales factores que influyen en el periodo de incubación tanto serológica (desde la infección hasta la detección de anticuerpos a un título significativo) como clínica (desde la infección hasta el aborto) son principalmente a).- dosis de exposición; b).- virulencia de la cepa; c).- tiempo de preñez y d).- resistencia individual del animal.

En una experiencia realizada en Inglaterra con dosis diferentes de una cepa virulenta el rango de variación del período de incubación fue de 14 a 227 días correspondiendo el periodo mas corto a la dosis más alta y el mas largo a la dosis menor.

El período tan variable de incubación serológica tiene sobretodo dos implicancias a).- en el diagnóstico de animales individuales y b) en la erradicación de la infección de un rodeo.

7.2.- EL DIAGNÓSTICO EN LOS ANIMALES INDIVIDUALES

El período variable de incubación explica la poca confiabilidad que tiene el diagnóstico serológico en animales individuales, si no proceden de rodeos libres de brucelosis

Un animal individual con reacción negativa a una prueba o aún a una combinación de pruebas, no ofrece garantías si procede de un rodeo infectado, ya que puede haber sido expuesto a la infección y encontrarse en el período de incubación.

Por consiguiente es recomendable que el animal adquirido con un diagnóstico negativo de brucelosis sea mantenido en aislamiento unos 90 días y luego sometido a un nuevo examen.

7.3.- INFLUENCIA DEL PERÍODO DE INCUBACIÓN SOBRE EL PROCESO DE ERRADICACIÓN DE LA BRUCELOSIS

EN UN RODEO. En consideración al período de incubación, es necesario repetir las pruebas en todos los animales para asegurar que no se deja un animal infectado que puede servir luego de fuente de infección al resto del rodeo. Es importante que la repetición de las pruebas se

hagan con intervalo fijo de 60-90 días para no dejar tiempo a que la reinfección se siga propagando.

Teniendo en cuenta también que el periodo de incubación puede ser muy prolongado no se debe otorgar la certificación de rodeo libre en menos de 6-9 meses después de la última prueba negativa del total del rodeo.

7.4.-EL DIAGNÓSTICO EN HEMBRAS PREÑADAS Y PARIDAS

Se ha observado que un número de hembras infectantes no desarrollan anticuerpos Ig G hasta el parto o una a tres semanas después. Estos animales pueden tener títulos bajos debido a IgM unas semanas antes, pero en un rodeo vacunado con cepa 19 no hay manera de decidir si se debe a la vacunación o a una infección reciente. Es posible que este fenómeno se deba al periodo de incubación cuando los animales son expuestos a la infección en los últimos meses de la preñez. La recomendación que se deriva de este hecho es la necesidad de repetir las pruebas a las 2-3 semanas después del parto o aborto, si las realizadas anteriormente resultaron negativas.

7.5.-EL DIAGNÓSTICO CON REFERENCIA A EDAD Y SEXO.

En los programas de erradicación se exceptúan del diagnóstico bovinos menores de 6 meses de edad. Si bien estos animales pueden infectarse por el calostro y la leche, la infección se acantona en los ganglios y se elimina espontáneamente en la mayoría de los casos. Últimamente se ha demostrado que un número no determinado pero pequeño de terneros que nacen de vacas infectadas pueden haberse infectado intrauterinamente y mantenido una infección latente, sin respuesta inmunológica, revelándose la enfermedad recién durante la primera parición o aborto, cuando acusan reacciones serológicas.

7.6 RODEOS PROBLEMA

En una pequeña proporción de rodeos, no se logra con las pruebas de rutina erradicar la infección o persiste la duda si esta fue erradicada. El término de "rodeo problema" es usado cuando se llevan a cabo procedimientos de erradicación y sin embargo continúan ocurriendo repetida o periódicamente reacciones sospechosas o positivas a la prueba del anillo en leche o a las pruebas estándar con suero sanguíneo. También pertenecen a esta categoría los rodeos sin antecedentes de infección durante años en los que ocurren reacciones positivas o sospechosas, sin haberse introducido animales infectados.

En estos rodeos problema puede haber uno o más animales con infección crónica que acusa reacciones a la aglutinación de título no significativo, por que es necesario recurrir a otras pruebas complementarias para descubrirlas.

DIAGNOSTICO DE BRUCELOSIS BOVINA

El servicio Nacional de Sanidad Animal resolvió establecer un Programa de Control y Erradicación de la Brucelosis Bovina en todo el país (Resolución 1269/93) El programa considera como pruebas oficiales de diagnóstico la PRUEBA DE BPA (Prueba en placa con antígeno bufferado) SEROAGLUTINACIÓN EN TUBO (SAT prueba lenta o de Wright) 2 mercaptoetanol, RIVANOL Y FIJACIÓN DE COMPLEMENTO. La prueba de BPA se utilizará como prueba tamiz. Es una prueba cualitativa de aglutinación en placa que presenta la ventaja de ser realizada en una sola dilución. El resultado se expresa como POSITIVO o NEGATIVO. Los animales se clasifican como negativos o reaccionantes debiendo estos últimos ser sometidos a pruebas complementarias para su diagnóstico definitivo. Los sueros que resulten positivos al BPA serán procesados por la prueba de seroaglutinación (SAT) en tubos y 2 mercaptoetanol (2-ME). Otra alternativa para los sueros positivos a BPA es la prueba de Rivanol, pero reservada para utilizarse en lugares donde se carezca de laboratorios con suficiente infraestructura o cuando por condiciones de manejo no se pueda esperar los resultados por períodos de 72 horas. La técnica de Rivanol no debe ser empleada para animales de importación o exportación, exposiciones ganaderas o envíos a la Patagonia. La prueba de 2 mercaptoetanol se basa en la propiedad que tiene la droga de inactivar las inmunoglobulinas IgM. Debe hacerse siempre en forma paralela y simultánea con la aglutinación lenta en tubos. La diferencia entre los títulos finales de ambas pruebas se interpreta como la capacidad aglutinante del suero debido a la presencia de anticuerpos anti IgM. La presencia de IgM se asocia generalmente con infección activa por lo que toda reacción en esta prueba debe ser considerada como indicativa de infección.

Los animales vacunados ocho o más meses antes de la realización de la prueba suelen tener solamente anticuerpos sensibles al mercaptoetanol. Los animales reaccionantes a esta prueba se deben considerar infectados aunque tengan antecedentes de vacunación, siempre que ésta haya sido efectuado por lo menos ocho meses antes. Los resultados negativos a la prueba de 2 mercaptoetanol no son concluyentes porque en el período inicial de la enfermedad la mayoría de los anticuerpos presentes son del grupo IgM.