

REFERENCIAS

- Babley CV, Paskett ME, Matthews NJ, Stenquist NJ: Prevalence and causes of ram epididymitis in Utah. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 186: 798-801, 1985.
- Biberstein EL, McGowan B, Olander H, Kennedy PC: Epididymitis in rams: Studies on pathogenesis. *Cornell Veterinarian* 54: 27-41, 1964.
- Bulgin MS, Anderson BC: Association of sexual experience with isolation of various bacteria in cases of ovine epididymitis. *American Journal of Veterinary Research* 182: 372-374, 1983.
- DeLong WJ, Waldhalm DG, Hall RF: Bacterial isolates associated with epididymitis in rams from Idaho and eastern Oregon flocks. *American Journal of Veterinary Research* 40:101-102, 1979.
- Hartley WJ: The pathology of *Brucella ovis* infection in pregnant ewes. *New Zealand Veterinary Journal* 9: 115-120, 1961.
- Keogh J, Doolette JB: The epidemiology of ovine brucellosis in South Australia. *Australian Veterinary Journal* 34: 412-417, 1958.
- Lee K, Cargill C, Atkinson H: Evaluation of an enzyme linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in ram lambs. *Australian Veterinary Journal* 62: 91-93, 1985.
- Loranzo EA: Etiologic significance of bacterial isolates from rams with epididymitis. *American Journal of Veterinary Research* 47: 64-65, 1985.
- Osburn BI, Kennedy PC: Pathologic and immunologic responses of the fetal lamb to *Brucella ovis*. *Veterinary Pathology* 110-136, 1966.
- Rhodes J, Schweitzer D, Kimberling C: *Brucella ovis* ELISA testing, principals and procedures, successes and failures. *Proceedings of Western Regional Coordinating Committee-46 Meeting*, pp 42-62, 1987.
- Scanlan CM, Healey MC: The API-ZYM system in the identification of facultative anaerobic gram-negative bacilli associated with epididymitis in ram lambs. *Proceedings of Symposium on Health and Disease of Small Ruminants*, pp 46-52, 1991.
- Scanlan CM, Healey MC, Torres AR, Johnston AV: Cultural and biochemical characterization of *Actinobacillus* and *Actinobacillus*-like species from ram lambs with epididymitis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1: 288-294, 1989.
- Swift BL, Weyerts PR: Ram epididymitis: A study on infertility. *Cornell Veterinarian* 55: 204-214, 1969.
- Walker RL, Biberstein EI, Pritchett RF, Kirkham C: Deoxyribonucleic acid relatedness among "*Haemophilus*", *somnus*", "*Haemophilus agni*", "*Histophilus ovis*", "*Actinobacillus seminis*", and *Haemophilus influenza*. *International Bacteriology* 35: 46: 1928-1930, 1986.

LABORATORIO DE DIAGNOSTICOS DE BRUCELOSIS BOVINA: REVISION.

Charles M. Scanlan

Universidad de Texas A & M, U.S.A.

INTRODUCCION

La Brucelosis en ganado es causada por el *Brucella abortus* bacteria intracelular facultativa gram-negativa. El organismo es fácilmente transmitido del ganado infectado al no infectado. La enfermedad es usualmente caracterizada por aborto aún durante o después del 5º mes de la primera gestación o por el nacimiento de un becerro débil. Usualmente las preñeces subsecuentes resultan en el nacimiento de becerros normales. En los Estados Unidos, fue iniciado un programa cooperativo Nacional Estatal-Federal para la erradicación de la brucelosis, en 1934. Desde entonces, ha habido una marcada reducción en la prevalencia de la enfermedad en el ganado desde aproximadamente el 11% al presente nivel de menos del 1%. Aunque muchos estados del norte y del oeste están libres de la enfermedad, algunos estados del sureste y suroeste todavía tienen una incidencia relativamente alta de brucelosis.

El diagnóstico definitivo de brucelosis requiere de aislamiento e identificación de la bacteria causante; sin embargo, no siempre es posible recuperar la *B. abortus* de animales vivos infectados. Por consiguiente, la mayoría de los diagnósticos están basados en el resultado de exámenes serológicos. Este resumen presentará información en cuanto a los antígenos e inmunoglobulinas las cuales interactúan en un número de exámenes comúnmente empleados en el diagnóstico serológico de brucelosis bovina. El significado de esos exámenes será discutido, así como la cultura y los métodos de identificación para la *B. abortus* y sus biovariedades.

DOGMA ACTUAL DE LOS ANTICUERPOS DEL SUERO DEL ANTI-*Brucella abortus*

De numerosas investigaciones epidemiológicas, el dogma emergió de la presencia de anticuerpos de suero para el *B. abortus* de la clase IgG son también indicativos de infección con *B. abortus* virulenta o debido a un anticuerpo calostrado pasivamente adquirido de las vacas infectadas, y los anticuerpos de suero de la clase IgM son indicadores de la vacunación con *B. abortus* atenuados, son debido al bajo título de los anticuerpos naturales o son de bacterias no-brucella que cruzan y reaccionan con los antígenos *B. abortus*.

En ganado naturalmente infectado con *B. abortus*, IgM es la primera clase de inmunoglobulina en aparecer en el suero y usualmente alcanzan altos títulos en infecciones agudas. El IgG aparece brevemente después, convirtiéndose en la clase predominante a medida que la respuesta del IgM decae. La IgG usualmente persiste tanto como el animal permanezca infectado. De las 2 subclases del IgG en el suero bovino (IgG1 e IgG2), la IgG1 es la más abundante y es el anticuerpo aglutinante y fijador del compuesto. La IgG y la IgA juegan solamente papeles menores en los exámenes serológicos usados para diagnosticar brucelosis.

Los anticuerpos pasivamente adquiridos, obtenidos de la ingestión de calostro de vacas infectadas decrecen y disminuyen, si algún anticuerpo anti-*B. abortus* permanece en los sueros de los becerros por el tiempo en que tengan 1 año de edad.

El *B. abortus* cepa 19 el cual fué originalmente aislado en 1923 tiene todas las características de *B. abortus* biovariedad 1; sin embargo, el cepa 19 puede ser distinguido bioquímicamente de (cepas de campo) del *B. abortus*. En 1939, cepa 19 fue oficialmente aprobada, en los Estados Unidos, para la erradicación de la brucelosis bovina. Actualmente, una dosis reducida es administrada solamente a vaquillas entre 4 y 12 meses de edad. Las reacciones serológicas resultantes de las vacunaciones de la becerria usualmente caían por debajo de los niveles antes de la primer lactación. En los becerros vacunados con cepa 19, la IgM aparecía primero, seguida de cerca por 10 días por la IgG. Los anticuerpos de la IgM anti-brucella decrecían con el tiempo y los aglutinamientos ocasionales persistentes son atribuidos a los anticuerpos de la clase IgG. En las vacas vacunadas con la cepa 19, las reacciones serológicas persistentes son muy comunes.

IgM es el principal componente de los aglutinamientos naturales del *B. abortus*. La IgG es también frecuentemente envuelta pero en una dimensión mucho menor. El involucramiento de la IgG2 E IgA no ha sido demostrado. Antigénicamente bacterias de mezcla reactiva incluyen ciertas cepas y serotipos de *Yersinia enterocolitica*, especies campilobacteras, *Escherichia coli*, especies de pasteurilla, y serovariedades de salmonella. Estas reacciones falso-positivas pueden ser diferenciadas de reacciones serológicas debido a brucelosis utilizando los exámenes serológicos suplementales.

ESTANDARIZACION DE LOS EXAMENES SEROLOGICOS

Antígenos y antisueros de referencia han ayudado a estandarizar los exámenes de aglutinación comunmente usados para diagnosticar brucelosis bovina. (Tabla 1). La célula entera suave del *B. abortus* cepa 1119-3 de referencia es empleada como el antígeno y es preparada en el Diagnostic Reagents Laboratory, U.S. Department of Agriculture, Ames, Iowa. El suero Internacional estandar de anti-*B. abortus* también ha sido ampliamente usado para estandarizar los exámenes. Métodos uniformes son usados para llevar a cabo el examen de la aglutinación en tubos estandar (STA), el examen 2-mercaptoetanol, y el rivanol.

Tabla 1. Exámenes serológicos usados en el diagnóstico de brucelosis

Examen de Aglutinación	Clase predominante de anticuerpos detectada	Resultados
Examen de Tarjeta	IgG	Cualitativos
Examen Mercaptoetanol	IgG	Cualitativos
Examen Rivanol	IgG	Cualitativos
Examen Tubo Estandar	IgM, IgG	Cualitativos

Hay un número de diferentes técnicas disponibles para el examen de la fijación del complemento (CF), tal comparación de los resultados del CF de laboratorio a laboratorio puede ser engañosa. La reacción envuelve a la aglutinación del tubo estandarizado del antígeno, complemento, y suero bajo examen. El examen puede ser hecho tanto como 37°C (fijación cálida) por 1 hora o hasta 4°C (fijación fría) sobre la noche la fijación fría es preferible porque dá títulos más altos y es menos probable que dé prozonas.

EXAMEN ESTANDAR DE AGLUTINACION EN TUBO

El examen STA es un examen (Time-Honored) que detecta todas las clases de inmunoglobulinas (IgM, IgG y IgA) en suero, considerando que los exámenes suplementarios difieren en su capacidad de detectar las variadas clases de inmunoglobulinas y subclases del IgG. Los defectos del STA incluyen: 1) La detección de anticuerpos "No específicos", así como anticuerpos que surgen de la infección de la *Brucella abortus* y la vacuna cepa 19, 2) el examen STA es a menudo el último examen en alcanzar niveles diagnósticamente significantes en las etapas de incubación de la enfermedad y después del aborto, y en las etapas crónicas de la enfermedad el examen STA a menudo se vuelve negativo cuando los resultados de exámenes suplementarios son positivos.

Tradicionalmente el status de la infección de ganado vacunado y no vacunado ha sido basado en los títulos del STA (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación del Status de Infección de la Brucelosis

Clasificación	TITULOS DE STA	
	Vacunados Oficiales	Todos los otros
Negativa	< + 1:50	< 1:50
Sospechosa	I1:100 a < I1:200	I1:50 a < I1:100
Positiva	> 1:200	> + 100

* Vaquillas vacunadas entre 4 y 12 meses de edad con la vacuna *B. abortus* strain 19

I = Aglutinación incompleta. + = Aglutinación positiva.

EXAMEN DE TARJETA

El examen de tarjeta fue desarrollado en los 70's y ha sido ampliamente usado como un examen clasificación de campo. El examen de tarjeta usa un antígeno que se tiñe de rosa bengala y tiene un bajo pH (3.6). El examen detecta principalmente IgG1, una subclase de anticuerpo que se aglutina pobremente excepto en un pH ácido, pero detecta poco, si algún, IgM e IgG2 son destruidos o inhibidos por el pH ácido. Los resultados del examen son clasificados como positivos o negativos. El examen de tarjeta usualmente va a detectar la infección más pronto de lo que lo haría el examen STA o los exámenes suplementarios de aglutinación.

El porcentaje de reacciones positivas falsas con el examen de tarjeta se estima que varía entre 1 y 3% dependiendo del nivel de la historia de infección y vacunación en un hato, mientras que las reacciones negativas falsas, se estiman de un 1 a 2%. En animales infectados naturalmente, el examen de tarjeta puede convertirse en positivo primero, seguido por los exámenes mercaptoetanol y rivanol. A medida que el título retrocede en el ganado vacunado con la cepa 19, y el examen rivanol es usualmente el primero en ser negativo, el examen mercaptoetanol es segundo, y el examen de tarjeta es el último.

EXAMENES SUPLEMENTARIOS DE AGLUTINACION

Los exámenes rivanol y mercaptoetanol son más fáciles de conducir y estandarizar que el examen CF y son comunmente usados. El examen rivanol es usualmente conducido como un examen de aglutinación en placa y tubo. El IgM presente en el suero es precipitado por rivanol. La prueba de mercapto etanol es una prueba de aglutinación en tubo similar a la prueba de STA. La IgM presente en el suero es inactivada por el 2-Mercapto etanol el cual rompe los enlaces disulfidos y previene a los anticuerpos de participar en la aglutinación. Estos exámenes son utilizados para diferenciar entre las respuestas de los anticuerpos asociados con los antígenos no-brucella, la vacuna cepa 19, y la infección *Brucella abortus*. Los títulos indican la cantidad, si alguno de los anti-brucella IgG aglutinados se presentan en el suero. Desde que la IgG es generalmente asociada con la presencia de la infección activa, cualquier título positivo puede ser considerado como una indicación de la infección o por lo menos una sospecha de ésta.

Títulos estáticos moderados bajos del STA en ganado vacunado, no son considerados significantes cuando los exámenes rivanol y/o mercaptoetanol son negativos, pero indican la presencia de una infección de *B. abortus* cuando los exámenes rivanol y/o mercaptoetanol son positivos.

EXAMENES DE FIJACION DE COMPLEMENTO

Los exámenes de fijación de complemento raramente exhiben reacciones "No-específicas" y son considerados los exámenes más seguros en la diferenciación de las respuestas serológicas de la vacunación en la becerrada debido a la infección con un *B. abortus* virulenta. Las infecciones en la vacunación de la cepa 19 conducen a la producción de los anticuerpos IgM, IgG2; sin embargo, la infección tiene un corto período de vida y los niveles de los anticuerpos del suero pronto declinan. Así, aproximadamente 6 meses después de la vacunación, la IgG2 desaparece del suero, pero las IgM e IgG1 a menudo persisten en bajos niveles. IgG, es el anticuerpo complementario-fijador persistente pero usualmente a los 6 meses post-inoculación el nivel del suero no es lo suficientemente alto como para dar una reacción positiva. Después de la infección con *B. abortus* virulenta, los títulos CF a menudo alcanzan los niveles de diagnóstico más pronto que el examen STA, pero a diferencia de los títulos del STA, estos no disminuyen a medida que la enfermedad se hace crónica. El examen CF es menos sensitivo que el de tarjeta, el rivanol o el mercaptoetanol.

EXAMEN DEL ANILLO EN LECHE

El examen del anillo en leche (MRT) es un examen de aglutinación cualitativa usado como un examen de monitoreo para determinar la posible presencia de brucelosis en hatos lecheros. El examen es muy sensible y usa un antígeno de la *B. abortus* teñido con hematoxilina (rojo) o tetrazolium (azul). Si la leche analizada es sospechosa, el antígeno se mantendrá dispersado en la leche. Las infecciones en la ubre normalmente siguen a infecciones sistémicas y no hay nivel significativo de anti-*B. abortus* en la leche hasta que la ubre está infectada. El MRT debe ser manejado, en hatos lecheros, en muestras de leche, en un volumen de mínimo 3 o preferiblemente 4 veces al año. Cuando se maneja 2 veces por año, algunas vacas van a estar lactando solo durante 1 de los exámenes. Por consiguiente, solamente un examen completo del hato va a obtenerse. Cuando se hacen en el año 4 MRT, es probable que una vaca individual perderá solo 1 examen y, por eso, obtendrá 3 exámenes de hato completos. En hatos sospechosos las vacas, deberán ser examinadas individualmente.

REGULACIONES A LOS EXAMENES SEROLOGICOS EN LOS ESTADOS UNIDOS

Las regulaciones de los exámenes de brucelosis de todo el ganado reproductor en el Comercio Intraestatal e Interestatal están resumidas (Tabla 3). En 1990, aproximadamente el 90% de los hatos infectados estaban en el sureste y el suroeste de los E.U.A.

Tabla 3. Examinación de brucelosis; métodos y reglas

Clase de Estado	Proporción de Infección	Pruebas regulatorias*	
		Intraestatal	Intreestatai
Libre	No infecciones en los últimos 12 meses	No requirió prueba	No requirió prueba
A	Menos del 0.25% del hato infectado	No requirió prueba	Un examen negativo pre-movimiento
B	Menos del 1.5% del hato infectado	Un examen negativo pre-movimiento	Un examen negativo pre-movimiento, previo permiso del estado o destino
C	Más del 1.5% del hato infectado	Un examen negativo pre-movimiento	Ganado vacunado: un examen negativo pre-movimiento. Ganado no vacunado: 2 exámenes negativos (60 días aparte) pre-movimiento. Antes del permiso del estado o del destinatario. El ganado se debe cuarentenar

*Regulaciones fueron efectivas en mayo de 1982

PROCEDIMIENTO DE CULTIVO E IDENTIFICACION

La *B. abortus* está a menudo presente en la leche, y en especímenes vaginales y tejidos en número muy pequeños. La infección de la ubre puede limitarse a 1 o más tetas; así, es esencial que la muestra contenga leche de todas las tetas. La *B. abortus* puede ser aislada de la leche en aproximadamente un 50% de las vacas infectadas. La bacteria puede a menudo ser recubierta por especímenes vaginales o uterinos tomados en el período de las 6 semanas que siguen el aborto o parto. Los fetos abortados y membranas fetales usualmente contienen grandes cantidades de brucelas; esto también es usual en las membranas de becerros infectados. Los especímenes más valiosos de los fetos abortados para su cultivo, son el contenido del estómago, pulmones y bazo. Los tejidos de las vacas de los cuales la brucella puede ser más usualmente aislada son los ganglios linfáticos asociados con el tracto digestivo, ubre, ganglios linfáticos supramamarios y útero post-parto.

Los medios sólidos son preferidos para el aislamiento de la *B. abortus*. La mayoría de las cepas de campo de *B. abortus* requieren la presencia de suero en el medio para su crecimiento. El agar triptosa con un 5% de suero y agar tripticase con un 5% de suero son recomendados como medios efectivos. *B. abortus* puede también crecer en agar sangre.

Donde hay contaminación significativa con organismos extraños es probable que sea encontrado, un medio selectivo que suprime el crecimiento de la bacteria contaminante y hongos sin interferencia significativa con el crecimiento de la brucella pueden ser inoculadas. Agregando antibióticos (cicloeximida, bacitracina, y polimixina B) o colorantes (cristal violeta, o etilvioleta) al agar de triptosa-suero y el de tripticase y suero son bastante efectivos suprimiendo la contaminación.

La mayoría de las cepas de campo de *B. abortus* requieren un incremento de CO₂ (de un 8 a 10%) para su crecimiento; sin embargo, el *B. abortus* cepa 19 es independiente del CO₂. La *B. abortus* tiene relativamente una proporción lenta de multiplicación, y es aconsejable mantener todos los platos de cultivo a 35°C por 8 o 10 días antes de desecharlos. Las colonias de Brucella generalmente se vuelven visibles después de que los cultivos han sido incubados por 3 días. Las colonias son de 2 a 4 mm. de diámetro, redondas, con márgenes lisos, translúcidos y tienen un color miel pálido. Las colonias más viejas son más grandes y más cafés microscópicamente, las brucelas son cocobacilos pequeños de un gram-negativo. De los 8 biovariedades de la *B. abortus*, solamente las biovariedades 1, 2 y 4, han sido recuperados de ganado en los E.U.A. la biovariedad 1 es la biovariedad aislado predominante seguido por los biovars 2 y 4, respectivamente. Las infecciones bovinas causadas por estas 3 biovariedades son epidemiológicamente indistinguibles; sin embargo, las biovariedades pueden ser distinguidas unas de otras por su habilidad para crecer en medio de agar conteniendo variadas concentraciones de tionina y fuchsina básica y por sus reacciones de aglutinación con antisuero monoespecífico abortus y mono-específico melitensis.

RESUMEN DEL DIAGNOSTICO DE LA BRUCELLOSIS BOVINA.

Los múltiples exámenes serológicos incrementan la confianza en el diagnóstico y los exámenes secuenciales proveen un mejor discernimiento que los exámenes sencillos. Los

errores baches más comunes en los exámenes serológicos incluyen: (1) el largo y variable período de incubación de la brucellosis bovina. (2) las variaciones en las respuestas individuales a la infección con ambos, la vacuna cepa 19 y el virulento *B. abortus*. (3) la respuesta humoral en relación con la etapa de preñez en el tiempo de exposición. (4) la presencia de anticuerpos de reacción-cruzada "no específicos" y (5) la respuesta humoral en relación al grado de inmunidad protectora con la vacunación de la becerrada y los adultos con cepa 19. También es importante como son interpretados los exámenes. Para hacer un diagnóstico de brucellosis bovina, es necesario usualmente perfeccionar una batería de exámenes serológicos y usar el "patrón de resultados" junto con la información epidemiológica y de cultivo. Si solo están disponibles los resultados serológicos, la interpretación de los resultados de los exámenes deben ser verificados a aquellos que sean familiares con todos los aspectos de la enfermedad. Aunque un gran número de exámenes serológicos están disponibles, los investigadores siguen buscando el examen perfecto, un examen simple y rápido que detectará un animal pronto en el período de incubación así como todas las etapas subsecuentes de la incubación, y que pudiera diferenciar entre las infecciones de la vacuna cepa 19 y las del virulenta *B. abortus*.

REFERENCIAS

- Alton GG, Jones LM, Dietz de: Laboratory techniques in brucellosis, 2nd ed. World health organization monograph series number 55, Geneva, 1975.
- Grawford rp, Hidalgo RJ (EDS): Bovine brucellosis: An International Symposium. Texas A&M University press, College Station, 1977.
- Unites States department of agriculture, animal plant health inspection service, veterinary services: brucellosis eradication uniform methods and rules. Effective april 1, 1981, aphis 91-1, U.S. Government printing office, 1981.