

Prueba de tarjeta modificada para el diagnóstico de la brucelosis caprina

Efrén Díaz Aparicio*,**
José María Blasco Martínez***
Francisco Suárez Güemes**

Abstract

Sensitivity and specificity of two different concentrations of the card test antigen for the diagnosis of Brucellosis in goats was evaluated. Antigens used were the oficial antigen produced by a national laboratory in Mexico ("Productora Nacional de Biológicos Veterinarios") with a cellular concentration of 8%, and an experimental antigen with a cellular concentration of 3%. Both antigens were made using *Brucella abortus* strain 1119-3 in a lactate buffer with a pH of 3.6. Sensitivity for the two antigens was determined using 53 sera from *Brucella melitensis* culture positive goats. Sera from 100 goats, negative to brucellosis and collected in a brucellosis free area were used for specificity determination. Sensitivity for the 8% cellular concentration was 79%. When the concentration was of 3%, sensitivity was 98%. Specificity for both antigens was 100%. It is concluded that the diagnosis of brucellosis in an 8% cellular concentration is not adequate due to its low sensitivity. The use of a 3% cellular concentration in the card test antigen for goats is recommended.

KEY WORDS: GOATS, BRUCELOSIS, CARD TEST.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar la sensibilidad y la especificidad de dos antígenos para la prueba de tarjeta utilizadas en el diagnóstico de la brucelosis caprina. Se usó el antígeno rosa de Bengala, que tiene una concentración celular del 8% y un antígeno experimental preparado a una concentración celular del 3%. Ambos antígenos se prepararon utilizando la cepa 1119-3 de *B. abortus*, con solución amortiguadora de lactato con pH 3.6. La sensibilidad de la prueba de tarjeta con ambos antígenos se determinó usando 53 sueros de caprinos con aislamiento bacteriológico de *B. melitensis*. Para determinar la especificidad se utilizaron 100 sueros de caprinos negativos a brucelosis, procedentes de zonas libres. La sensibilidad del antígeno rosa de Bengala al 8% fue del 79% y la del antígeno al 3% fue del 98%. La especificidad para los dos antígenos fue del 100%. El diagnóstico de la brucelosis en caprinos con la prueba de tarjeta usando el antígeno rosa de Bengala al 8% es inadecuado en caprinos debido a su baja sensibilidad, por lo que es recomendable la utilización del antígeno rosa de Bengala preparado a una concentración del 3%.

PALABRAS CLAVE: CAPRINOS, BRUCELOSIS, PRUEBA DE TARJETA.

Introducción

La prueba de tarjeta (PT) es reconocida por la Norma Oficial Mexicana (NOM) como prueba tamiz para el diagnóstico de la brucelosis en caprinos, como prueba confirmatoria se recomienda la fijación del complemento (FC)¹.

Para la realización de la PT se utiliza antígeno preparado con la cepa 1119-3 de *Brucella abortus*, la cual es útil para la detección de anticuerpos inducidos tanto por *B.*

abortus como por *B. melitensis*, ya que estas especies bacterianas comparten antígenos de superficie. Sin embargo, éstos se encuentran en diferentes concentraciones en las mencionadas bacterias,² lo que hace que la sensibilidad y especificidad varíen cuando la prueba se utiliza para el diagnóstico en bovinos que en México son principalmente afectados por *B. abortus* y en caprinos que se infectan sobre todo por *B. melitensis*³. La PT tiene como base que los anticuerpos que aglutinan en forma inespecífica con el antígeno de brucelas lisas

Recibido el 6 de agosto de 1998 y aceptado el 14 de abril de 1999.

*Proyecto Brucelosis, Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas, y Pecuarias, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, km 15.5, Carretera México-Toluca, 05110, México, D.F. Fax: 55-570-40-73. Teléfono 55-70-38-86.

Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

**Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

***Departamento de Sanidad Animal, Servicio de Investigación Agropecuaria, Diputación General de Aragón, Zaragoza, España.

se inhiben a pH 3.6, pero bajo estas condiciones se mantiene la actividad de los anticuerpos específicos⁴.

En caprinos, como pasa con el resto de las pruebas serológicas, los ensayos comparativos de sensibilidad y especificidad para la PT son muy limitados, la mayoría de los datos han sido obtenidos en cabras sin aislamiento de *Brucella*; por lo tanto, son de un valor relativo^{5,6,7}.

Estudios realizados en otros países en ovinos y caprinos^{8,9,10} con el fin de determinar la sensibilidad y especificidad de la PT, han demostrado la necesidad de ajustar la concentración celular del antígeno con el fin de optimizar la sensibilidad de la prueba, como un requisito indispensable para contar con una buena prueba tamiz.

Por lo anterior, se realizó el presente estudio, el cual tuvo como objetivo determinar la sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la brucelosis caprina de la PT, con el antígeno oficial que tiene una concentración celular del 8% y con un antígeno experimental realizado a una concentración celular del 3%.

Material y Métodos

Estudio bacteriológico

Se realizó a partir de 60 cabras de un hato de aproximadamente 120 animales, con elevada seroprevalencia de brucelosis a la PT al 8% de concentración celular y FC, estos animales se sacrificaron y de ellos se obtuvieron las siguientes muestras: bazo, útero, glándula mamaria, nódulos linfáticos supramamarios, retrofaríngeos y submaxilares. Los tejidos fueron colectados de manera aséptica guardándose en congelación, se realizó la disección a las muestras para remover la grasa y tejido excedente, se sumergieron en alcohol al 70% y se flamearon, se cortaron en pedazos pequeños y se depositaron en bolsas nuevas de plástico, macerando las muestras. Se añadió solución salina fisiológica estéril, procesándose en un macerador de tejidos, esta suspensión se sembró en medio Farrell utilizando hisopo, se dejaron incubando las muestras a 37°C en una atmósfera de 5% a 10% de CO₂, durante 10

días, la identificación de las cepas aisladas se realizó mediante tinción de Gram, prueba bioquímicas, serotipificación, fagotipificación, crecimiento en colorantes y antibióticos¹¹.

Muestras serológicas

Para determinar la sensibilidad, se utilizaron sueros de 53 caprinos a partir de los cuales se obtuvo mediante un estudio bacteriológico, el aislamiento de *B. melitensis*. Para evaluar la especificidad, se usaron 107 sueros de caprinos negativos a brucelosis, procedentes de un hato localizado en una zona libre de brucelosis.

Para determinar la sensibilidad y especificidad relativa se utilizaron sueros de 101 caprinos procedentes de dos hatos no vacunados, procedentes de zonas endémicas de brucelosis, los valores de sensibilidad y especificidad relativa se calcularon comparando los valores obtenidos con la PT con los de FC.

Pruebas serológicas

Se llevaron a cabo la PT y la FC¹¹. La PT se realizó utilizando dos antígenos de rosa de Bengala, preparados por la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios, ambos antígenos tenían pH de 3.6 y fueron preparados con solución amortiguadora de lactato utilizando la cepa 1119-3 de *B. abortus*. Uno de los antígenos que era el de uso oficial tenía una concentración celular referida del 8%. El otro antígeno de rosa de Bengala usado fue preparado de forma experimental, a una concentración celular del 3%. La concentración celular se determinó mediante el uso de tubos de Hopkins y la centrifugación¹¹.

Los valores de sensibilidad y especificidad se obtuvieron siguiendo la fórmula descrita en la literatura¹². Cabe destacar que para determinar estos valores con precisión es necesario disponer de sueros testigos procedentes de animales con bacteriología conocida. En caso de no conocerse el estado bacteriológico, la sensibilidad debe obtenerse de forma relativa comparando los valores de

Cuadro 1

DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA PRUEBA DE TARJETA AL 8%, CON BASE EN LOS RESULTADOS DE 53 SUEROS DE CAPRINOS CON AISLAMIENTO DE *Brucella melitensis* Y DE 100 SUEROS DE CAPRINOS PROCEDENTES DE ZONAS LIBRES DE BRUCELOSIS Y SIN AISLAMIENTO DE *Brucella melitensis*

	Aislamiento bacteriológico			Total
		Positivos	Negativos	
Prueba de tarjeta al 8%.	Positivos	42 (a)	0 (b)	52(a + b)
	Negativos	11 (c)	100 (d)	101 (c + d)
	Totales	53 (a + c)	100 (b + d)	153(a+b+c+d)

Sensibilidad = $a/(a + c) = 42/(53) = 79\%$
Especificidad = $d/(b + d) = 100/(100) = 100\%$

las pruebas a evaluar con la prueba que presenta la sensibilidad más alta.

Resultados

Se logró obtener aislamiento de *B. melitensis* en por lo menos un tejido de 53 de las 60 cabras trabajadas, los aislamientos fueron identificados como biotipo 1 cepa de campo.

La sensibilidad de los dos antígenos utilizando los 53 sueros con cultivo positivo fue para la PT con el antígeno al 8% de 42 reactores, dando una sensibilidad del 79% (Cuadro 1). La PT con el antígeno al 3% dio 52 reactores con una sensibilidad del 98% (Cuadro 2). La FC presentó 53 reactores mayores a una dilución entre 1:4 a 1:340, dando así una sensibilidad del 100%.

Al calcular la especificidad de los 107 sueros negativos, la PT con el antígeno al 8%, al 3% y la FC, no presentaron ningún reactor; por lo tanto, la especificidad para las tres pruebas fue del 100% (Cuadro 3).

En las cabras de zonas endémicas de brucelosis, de los 101 sueros, resultaron 47 positivos a FC, a títulos 1:4 o

mayores, la PT con antígeno al 8% encontró 23 positivos (sensibilidad relativa del 49%). La PT con el antígeno al 3% dio 43 positivos y 4 negativos, por lo que su sensibilidad relativa fue del 92%. La especificidad relativa de la PT con antígeno al 8% fue del 100%, ya que de 54 muestras negativas a FC la PT no presentó ningún positivo. La PT con antígeno al 3%, dio 53 negativos y 1 positivo, dando, por tanto, una especificidad relativa del 98% (Cuadro 4).

Discusión

Las cepas identificadas fueron biotipo 1 de *B. melitensis*, que es el aislado con mayor frecuencia en caprinos de México³.

Respecto del grupo de cabras negativo, se consideró así por resultar aquéllas seronegativas, pero sobre todo por venir de una zona *sui generis* de México, donde en estudios repetidos desde hace por lo menos 10 años no se han encontrado animales positivos a brucelosis y, por lo tanto, no se ha vacunado.*

Cuadro 2

DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA PRUEBA DE TARJETA AL 3%, CON BASE EN LOS RESULTADOS DE 53 SUEROS DE CAPRINOS CON AISLAMIENTO DE *Brucella melitensis*, Y DE 100 SUEROS DE CAPRINOS PROCEDENTES DE ZONAS LIBRES DE BRUCELOSIS Y SIN AISLAMIENTO DE *Brucella melitensis*

Prueba de tarjeta al 3%.	Aislamiento bacteriológico		
	Positivos	Negativos	Total
Positivos	52 (a)	0 (b)	52 (a + b)
Negativos	1 (c)	100 (d)	101 (c + d)
Totales	53 (a + c)	100 (b + d)	153(a+b+c+d)

Sensibilidad = $a/(a + c) = 52/(53) = 98\%$
 Especificidad = $d/(b + d) = 100/(100) = 100\%$

Cuadro 3

COMPARACION ENTRE TITULOS DE FIJACION DE COMPLEMENTO Y DOS PRUEBAS DE TARJETA CON DIFERENTE CONCENTRACION CELULAR DEL ANTIGENO ROSA DE BENGALA, UTILIZANDO 53 SUEROS DE CABRAS CON AISLAMIENTO DE *B. melitensis*

Títulos de la Fijación del complemento	Prueba de tarjeta			
	Antígeno a una concentración celular del 8%		Antígeno a una concentración celular del 3%	
	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
1:4	3	0	1	2
1:8	2	4	0	6
1:16	3	7	0	10
1:32	1	14	0	15
1:64	2	17	0	19
Total	11	42	1	52

Cuadro 4

COMPARACION ENTRE TITULOS DE FIJACION DE COMPLEMENTO Y DOS PRUEBAS DE TARJETA CON DIFERENTE CONCENTRACION CELULAR DEL ANTIGENO ROSA DE BENGALA, UTILIZANDO 101 SUEROS DE CAPRINOS SIN AISLAMIENTO DE BRUCELAS

Títulos de la Fijación del complemento	Prueba de tarjeta			
	Antígeno a una concentración celular del 8%		Antígeno a una concentración celular del 3%	
	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
Negativos	54	0	53	1
1:4	10	2	4	8
1:8	13	6	0	19
1:16	0	3	0	3
1:32	0	8	0	8
1:64	0	5	0	5
Total	77	24	57	44

Los resultados de este trabajo cuestionan la utilidad de la PT al 8% como prueba tamiz, ya que la finalidad de este tipo de pruebas es no dejar pasar ningún animal falso negativo, o sea el ideal es tener 100% de sensibilidad, ya que los animales negativos a la prueba tamiz se dan sin duda como tales, y sólo se confirman mediante otras pruebas a los animales positivos, por lo que la especificidad no necesariamente tiene que ser muy alta ¹².

La NOM de la campaña contra la brucelosis señalaba anteriormente el uso de la PT para caprinos, usando el antígeno a una concentración celular del 8%, pero este antígeno no es adecuado, debido a su baja sensibilidad. Es recomendable utilizar el antígeno a una concentración celular del 3% debido a que así aumenta la sensibilidad de la PT para el diagnóstico de la brucelosis caprina.

El hecho de que la sensibilidad relativa de la PT al 8% y al 3% resultasen inferiores a la encontrada para la FC, coincide con los datos encontrados en otro trabajo, donde de 407 cabras de 16 hatos infectados, 150 sueros fueron positivos a la FC y de éstos 131 fueron positivos a la PT; por lo tanto, la sensibilidad relativa de la PT fue del 87.7% ⁴. Sin embargo, esta situación de que los sueros sean positivos a la FC y negativos a la PT es inusual, ya que lo más común es que los sueros de caprinos y ovinos son en mayor proporción positivos a la PT que a la FC ¹³. En un trabajo con caprinos procedentes de hatos con diferentes grados de prevalencia de brucelosis ⁸, se evaluó la sensibilidad relativa de cuatro antígenos para la PT, preparados a concentraciones celulares que fueron del 3% al 9%, encontraron con todos ellos una sensibilidad relativa del 100% con respecto a la FC, resultados que difieren de los observados en este trabajo donde la concentración celular tiene una relación inversamente proporcional con la sensibilidad relativa.

La idea de modificar la concentración celular del antígeno para aumentar la sensibilidad de la prueba parte de dos trabajos, en uno de ellos al evaluar la PT en sueros de ovinos con diversos antígenos, con concentraciones celulares del 3% al 20%, a una proporción suero-antígeno de 3:1, se aumenta la sensibilidad de la prueba con respecto a su uso normal de 1:1 ⁸. Esta modificación fue aplicada también al evaluar sueros de caprinos utilizando un antígeno para la PT a una concentración celular entre 4% a 5%, la sensibilidad fue del 90%, a la proporción normal de suero-antígeno 1:1, cuando la proporción se utilizó de 3 partes de suero (75 µl) y una de antígeno (25 µl) la sensibilidad aumentó a 100% ⁹.

Esta modificación es similar al utilizar el antígeno a una concentración celular del 3%. Una sensibilidad del 100% se obtuvo utilizando antígeno rosa de Bengala producido por el Centro Nacional de Referencia para la Brucelosis de Santa Fe, Granada, España, a una concentración celular del 3% con pH de 3.65 en solución amortiguadora de lactatos, con la cepa S-99 ¹⁰.

Al utilizar la PT para el diagnóstico de brucelosis en bovinos y ovinos, el procedimiento de disminuir la concentración celular del antígeno rosa de Bengala del 8% al 5%, hace aumentar la sensibilidad de la prueba ¹⁴. En bovinos, sin embargo, la PT con antígeno al 8%, ha resultado ser una excelente prueba tamiz por su elevada sensibilidad ¹⁵.

La NOM de la Campaña contra la Brucelosis Animal, señala en sus últimas versiones que se debe utilizar para la PT en caprinos el antígeno preparado a una concentración celular del 3%, esto último con base en los resultados aportados por este trabajo de investigación ¹.

Referencias

1. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995. Campaña Nacional Contra la Brucelosis en los Animales. Diario Oficial. México (DF) 20 agosto 1996:43-66.

* Comunicación personal del MVZ Jesús Baez, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Zacatecas (Zacatecas, México).

2. Moriyón UI. *Brucella* cell structure. Abstracts of the 50th Anniversary Meeting of the Brucellosis Research Conference; 1997 November 8-9; Chicago (ILL). Chicago (ILL): Brucellosis Research Association, 1997:3-18.
3. Villegas AH. Estudio bacteriológico y fagotipificación de brucelas aisladas de caprinos y bovinos (tesis de licenciatura). México (DF): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1997.
4. Pappous H, Hountou A. Serological control of brucellosis by the rose bengal and complement fixation tests. *Deltion Ellenikes Kteniatrikes Etaireias* 1988;39:54-60.
5. Falade S. A comparison of three serological tests in the diagnosis of caprine brucellosis. *Res Vet Sci* 1978;24:376-377.
6. Whagela S, Wandera JG, Wagner GG. Comparison of four serological tests in the diagnosis of caprine brucellosis. *Res Vet Sci* 1980;28:168-171.
7. Alton GG, Fensterbank R, Plommet M, Verger JM. La brucellose de la chèvre. Resummé to les Maladies de la Chèvre; 1984 octobre 911; Niort, France. Niort, France: INRA 1984; 28:69-91.
8. Blasco MJM, Garin-Bastuji B, Marín CM, Gerbier G, Fanlo J, Jiménez de Bagués MP, et al. Efficacy of different rose bengal and complement fixation antigens. for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *Vet Rec* 1994;134:415-420
9. Díaz-Aparicio E. Diagnóstico serológico de la brucelosis caprina (tesis doctoral). Pamplona, España: Universidad de Navarra, 1993.
10. Díaz-Aparicio E, Marín C, Alonso-Urmeneta B, Aragón V, Pérez-Ortiz S, Moriyón UI. Evaluation of serological tests for diagnosis of *Brucella melitensis* infection of goats. *J Clin Microbiol* 1994;32:1159-1165.
11. Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. Techniques for the brucellosis laboratory. Paris, France: INRA, 1988.
12. Thursfield M. Epidemiología veterinaria. Zaragoza, España: Acribia, 1990.
13. Blasco MJM. Diagnóstico de la brucelosis ovina y caprina. Jornadas Internacionales sobre Brucelosis; 1995 noviembre 23-25; Madrid, España. Madrid, España: Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense, 1995:150-176.
14. Trap D, Gaumont A. Le diagnostic serologique de la brucellose bovine et ovine par l'a antigene tamponne. *Bull Mens Soc Vet Prac (France)* 1976;60:301-307.
15. Reyes PR. Evaluación de la sensibilidad y especificidad de diferentes pruebas serológicas para el diagnóstico de brucelosis bovina (tesis de licenciatura). Cuautitlán, Edo. de México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM, 1996.