

Diagnóstico de laboratorio de la Brucelosis bovina

Dra. Alejandra Suanes MSA
Departamento de Bacteriología
DILAVE-DGSG

asuanes@mgap.gub.uy

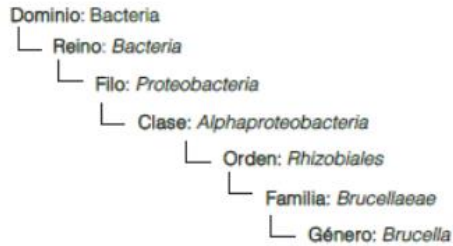
Brucelosis

- La brucelosis es una enfermedad zoonótica de distribución mundial que afecta a una amplia gama de mamíferos domésticos y salvajes.
- Es producida por una bacteria del género *Brucella spp.*
- La Brucelosis es una enfermedad de declaración obligatoria en la mayoría de los países

Patógeno de nivel 3:

- Clasificado como agente potencial de bioterrorismo debido al riesgo de transmisión por aerosol y a que no existen vacunas humanas

Taxonomía



Especies	Biотipos	Hospedador preferencial	Potencial zoonótico
<i>B. melitensis</i>	1-3	Oveja y cabra	+
<i>B. abortus</i>	1-6,9	Vaca, camello, búfalo	+
<i>B. suis</i>	1-5	Cerdo (1-3), liebre (2), jaball (2), caribú (4), reno (4), roedores (5)	+
<i>B. canis</i>	-	Perro	+
<i>B. ovis</i>	-	Oveja	-
<i>B. microti</i>	-	Roedores	-
<i>B. neotomae</i>	-	Roedores	-
<i>B. ceti</i>	-	Cetáceos	+
<i>B. pinnipedialis</i>	-	Pinnípedos	+
<i>B. inopinata</i>	-	Humano	NA

NA: No aplica

Figura 1. Encuadre taxonómico y principales características de las especies del género *Brucella* (Godfroid *et al.*, 2011; OIE, 2009a).

La familia *Brucellaceae* está compuesta por los géneros *Brucella*, *Mycoplana* y *Ochrobactrum* (Bergey y Holt, 1994).

Ochrobactrum intermedium es una especie muy relacionada filogenéticamente con el género *Brucella* (Moreno *et al.*, 2002; Velasco *et al.*, 1997; Velasco *et al.*, 1998) lo que la convierte en la responsable de una gran parte de los resultados falsos positivos en las técnicas moleculares basadas en la detección de ácidos nucleicos (Romero *et al.*, 1995).

Género *Brucella* spp.

Actualmente, se han reconocido nueve especies de *Brucella* spp.:

- *B. abortus* (sobretudo a bovinos)
- *B. melitensis* (ovino y caprino)
- *B. suis* (ganado porcino y fauna salvaje)
- *B. neotomae* (rata del desierto)
- *B. ovis* (ovinos)
- *B. canis* (caninos)
- *B. ceti* (cetáceos)
- *B. pinnipedialis* (lobos marinos y focas) y *B. microti* (que infecta a los roedores).
- *B. nosferati* (murciélagos)
- Existen otras especies , por ejemplo, *B. inopinata* y *B. papionis*, que corresponden a aislamientos esporádicos de roedores, humanos o babuinos (Whatmore 2009; Whatmore, Davison, Cloeckert et al. 2014)

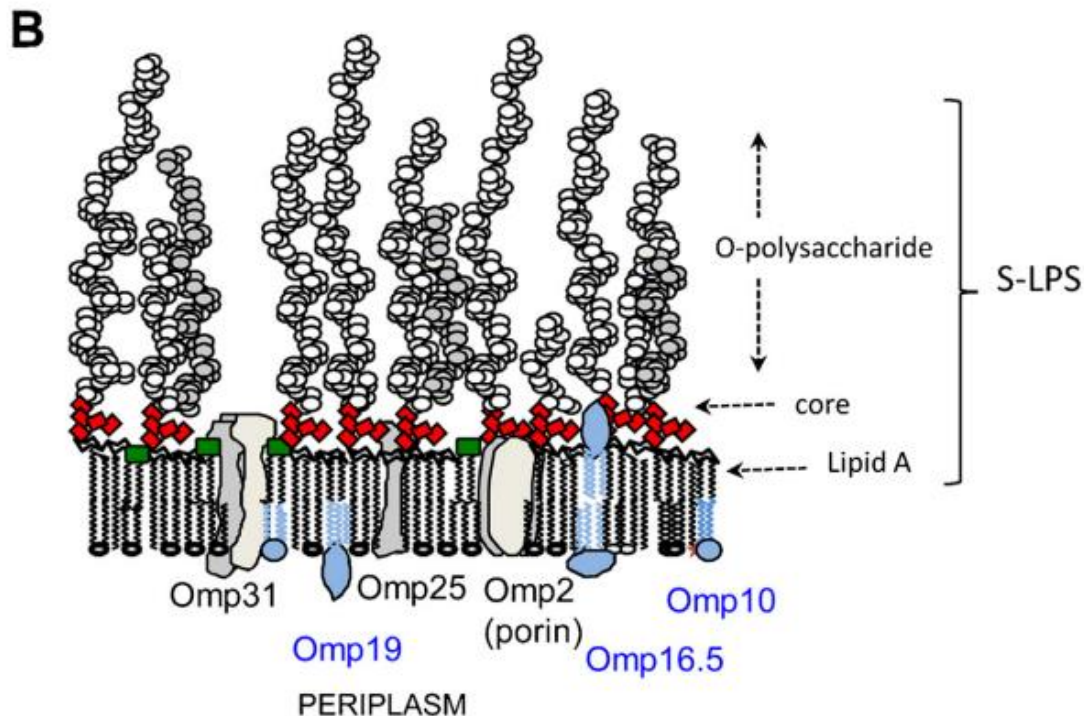
Género *Brucella spp.*

- Gram negativo
- Tamaño: coco-bacilos 0,5 a 0,7 μm x 0.6 a 1.5 μm
- Acido Alcohol Resistente débiles
- Inmóviles y no esporulados
- Son aeróbicos, pudiendo utilizar el oxígeno o el nitrato como aceptores terminales de electrones.
- *B. abortus* necesitan tensión de CO_2 elevada para su crecimiento en condiciones artificiales y en cultivos primarios.

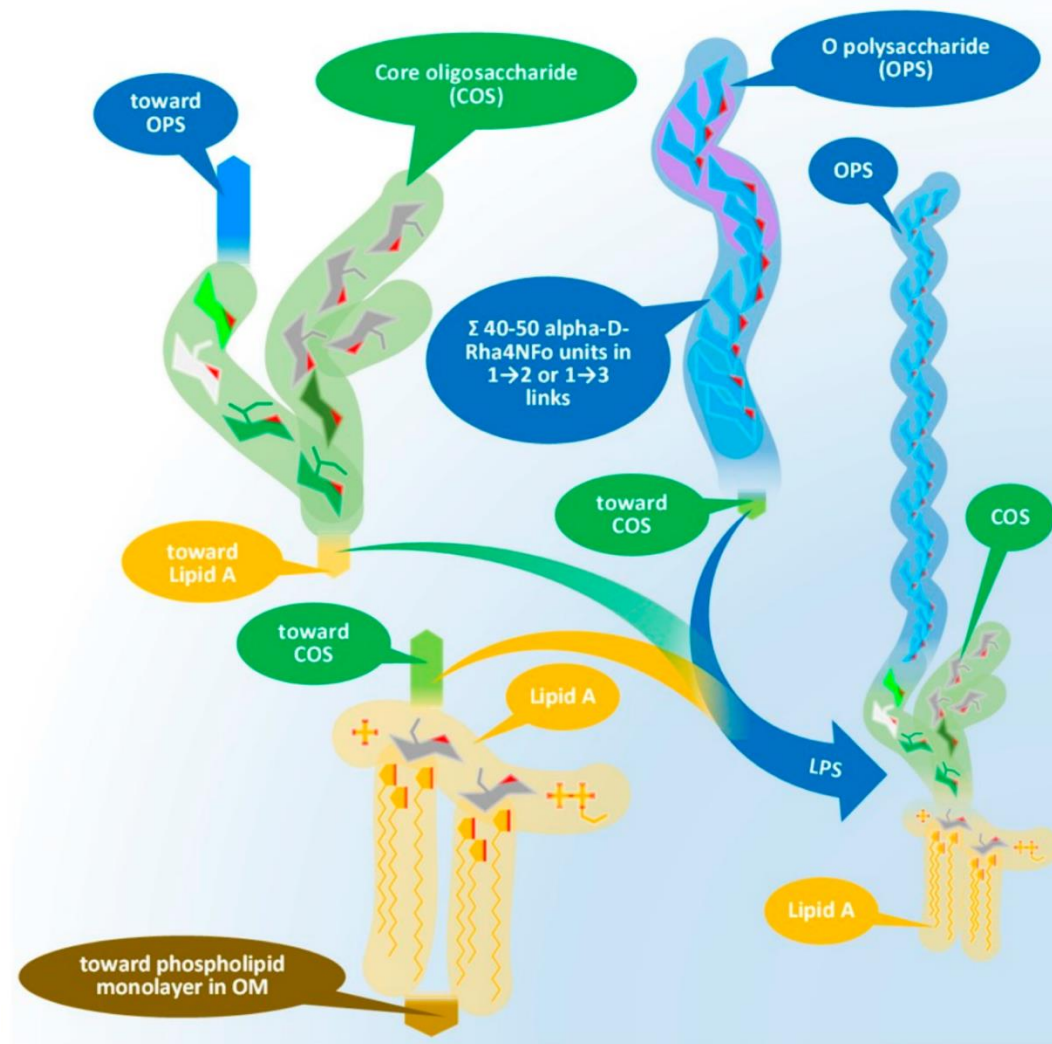
Género *Brucella spp.*

- La *Brucella* resiste bien en el medio ambiente.
- Puede sobrevivir en agua, fetos, restos de placenta y objetos inanimados varios meses si las condiciones de temperatura, pH y luz son favorables.
- La pasteurización, hervor y otros métodos de esterilización eliminan el microorganismo.
- En la leche sin pasteurizar puede vivir varios meses.
- La mayoría de los desinfectantes (formol, hipoclorito, fenol, xileno) son activos en soluciones acuosas.

Existen colonias lisas (*B.abortus*, *B.suis*, *B. melitensis*) o rugosas(*B. ovis* y *B. canis*) esta característica depende de la constitución de los LPS de la pared celular

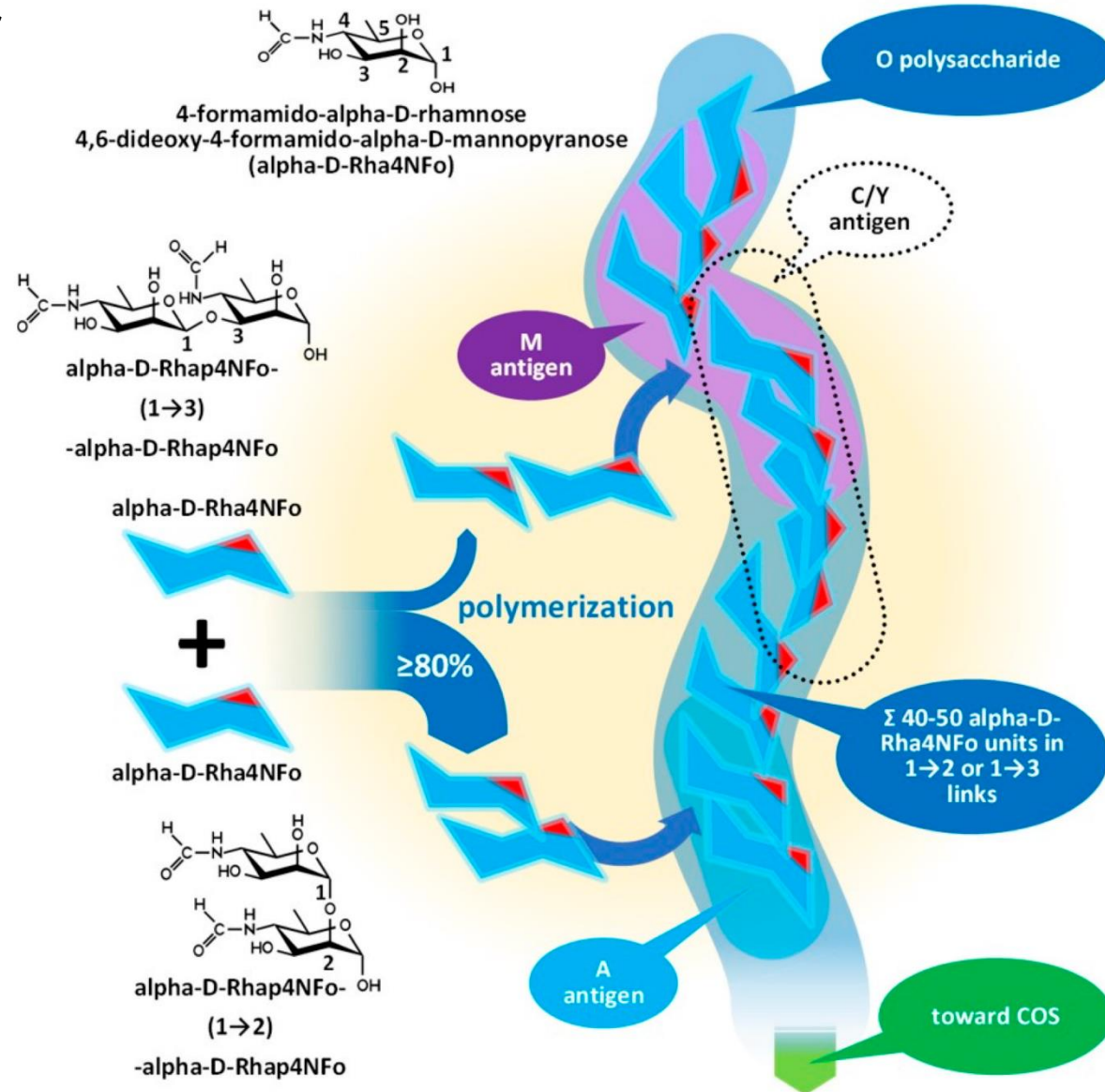


Pared Celular



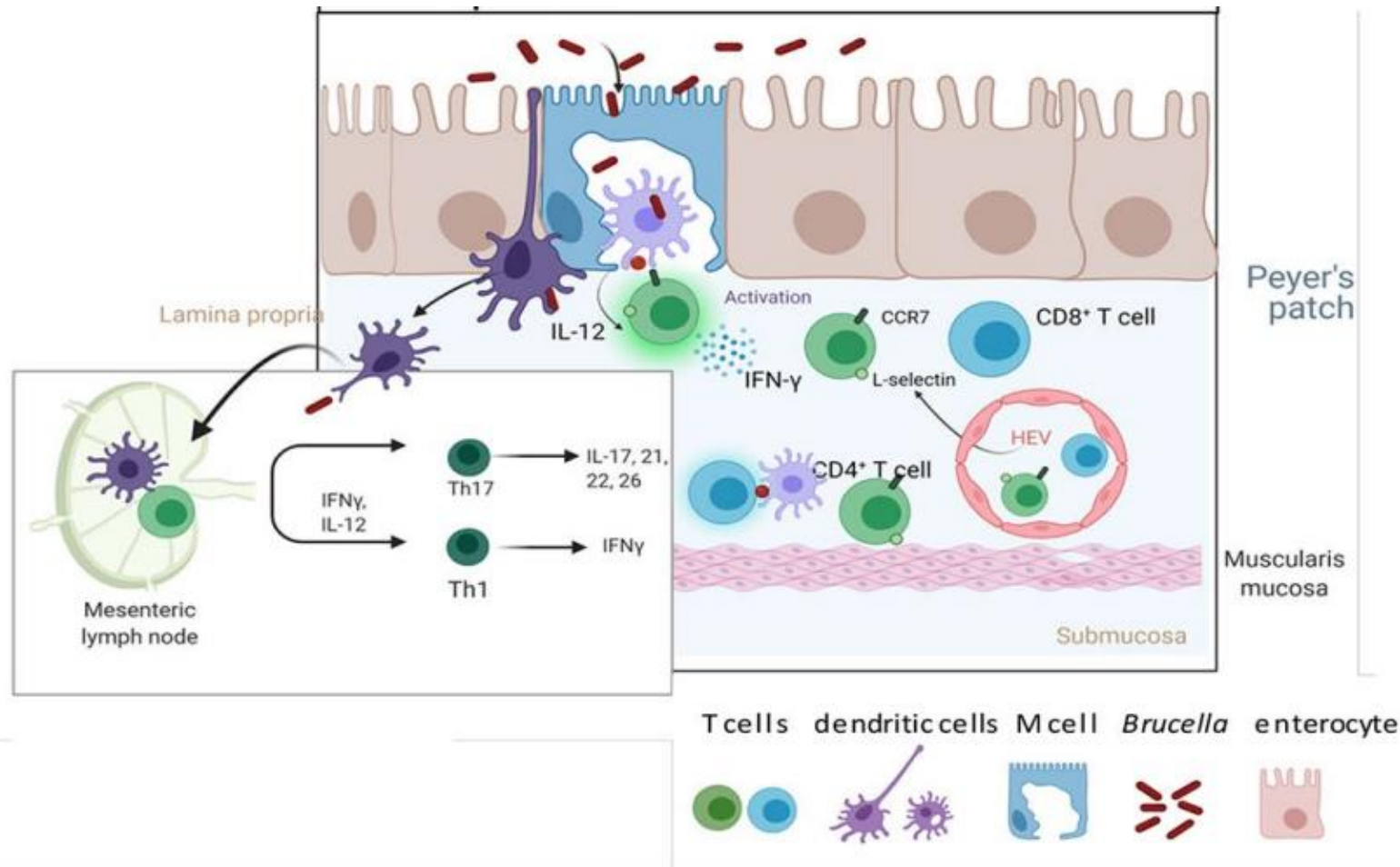
El ensamblaje del LPS de bacterias Gram-negativas (*Brucella*), La composiciones químicas de los componentes principales .
 LPS: Lipopolisacárido, OPS: Polisacárido específico O, COS: Oligosacárido central y OM: Membrana externa.

Pared Celular



Falsos positivos: Y. enterocolitica O:9, E. coli O:157, S. urbana O:30, E. hermanii, Francisella tularensis, P. maltophilia y Vibrio cholerae,

Inmunidad



El LPS es considerado un antígeno T independiente, capaz de activar a los linfocitos B sin la participación de los LTH.

Los primeros anticuerpos que se generan en el curso de una infección son de clase IgM, seguidos de IgG e IgA,

El período de incubación puede ser tan breve como 10 días y tan largo como 280 días (frec. aparición de Ac a las 3 a 12 semanas).

Transmisión:

- Ingestión, inhalación de aerosoles, contacto en la mucosa nasal y conjuntival, abrasiones cutáneas, IA y transmisión vertical.

Fuente de infección:

- Tejidos y fluidos del aborto (feto, placenta, exudado vaginal), leche, semen, orina y sangre.
- Inseminación de vacas con semen de toros infectados.
- Los animales maduros son más susceptibles y permanecen infectados de por vida.
- Autoinoculación accidental de vacunas de Brucella por parte de veterinarios.

- Clínicamente, la enfermedad se caracteriza por uno o más de los siguientes signos clínicos:
 - aborto,
 - terneros nacidos muertos o débiles,
 - retención de la placenta,
 - orquitis,
 - epididimitis,
 - artritis, y
 - reducción de la producción de leche
- Infectar el sistema fagocítico mononuclear y el tracto reproductivo.
- Localización preferente de la *Brucella* es el útero de las hembras preñadas.
- Excreción del microorganismo en las descargas uterinas y en la leche.

Diagnóstico de Laboratorio

- Métodos directos:

Se basan en evidenciar la presencia de la bacteria o de sus componentes en los tejidos de los animales o del hombre.

- Métodos Indirectos:

Detectan la respuesta inmune del huésped (celular y humoral).

- Humoral: El animal responde a la infección con la producción de inmunoglobulinas , IgM, IgG₁, IgG₂ e IgA

Las dificultades propias de la implementación del aislamiento de *Brucella* a partir de los distintos tejidos hacen que los métodos indirectos sean el recurso diagnóstico más utilizado

Métodos directos

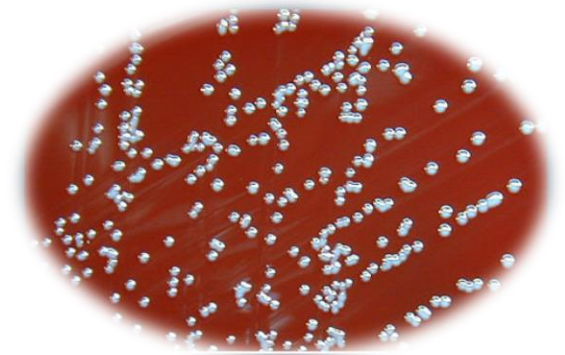
1. Aislamiento Bacteriano

- Medios selectivos y no selectivos
- Incubación: cultivar con 5-10% de CO₂ a 37° C

1. Métodos de tinción de gram: Frotis (órganos, fluidos corporales), gram -

2. Ziehl-Neelsen modificada por Stamp: Los microorganismos se tiñen de rojo en un fondo azul, se usa un ácido débil.

3. PCR



Métodos indirectos

Pruebas tamiz con alta sensibilidad:

- Pruebas de aglutinación del suero:
 - RBT (prueba de la placa de rosa de bengala)
 - BPAT (prueba del antígeno en placa acidificado con tampón)
- ELISA indirecto

Pruebas confirmatorias con alta especificidad:

- Aglutinación de Rivanol
 - Fijación del complemento
 - ELISA competición
 - Ensayo de polarización de fluorescencia (FPA)
-
- En Uruguay se usan pruebas en series (aumento de especificidad) se utilizan primero la prueba de Rosa Bengala y posteriormente FPA.

Departamento de Bacteriología

- Servicio de Brucelosis (4 lab. de Dilave)

- Serología

- Muestras de sangre
- Pruebas presuntivas (Rosa Bengala)
- Prueba confirmatorias (Polarización Fluorescente)
- Motivos de estudio: Investigación Oficial, Aborto, Rastreo/lindero, Muestreo Panel, Muestreo Faena y Exportación.
- Los resultados de las pruebas son ingresados por el Dilave en el Sistema de Información de Salud Animal (SISA).

- Bacteriología y PCR (AMOS)

Resolución N° 175/015 de DGSG (*Procedimiento de atención de foco de Brucelosis bovina*) y Decreto 441/012, queda establecido la definición de foco de brucelosis y las pruebas diagnósticas autorizadas.

Interlaboratorio SENASA 2022:

- Dilave realiza anualmente un ensayo de interlaboratorios que es enviado por el laboratorio de referencia de la OMSA/FAO, SENASA Argentina.
- Se recibió un panel de 20 muestras, para las cuales se realizó la prueba de Rosa Bengala y Polarización Fluorescente.
- Ultimo informe de SENASA con resultado SATISFACTORIO para los 4 laboratorios de Dilave.

Antígeno de Rosa Bengala

- El antígeno de Rosa Bengala utilizado por los 4 laboratorios de Dilave es de producción propia.
- Para la producción del antígeno de Rosa Bengala se siguen los estándares internacionales OMSA.

Controles del antígeno

- Establecidos por los manuales de la OMSA.
- Se realiza doble control, uno interno por el Departamento de Bacteriología y otro por el Departamento de Control de Productos Veterinarios, Sección de Evaluación de Biológicos.
- Controles:
 1. Esterilidad
 2. Volumen Celular
 3. Sensibilidad: Se enfrenta el antígeno a un suero patrón OIEISS dilución 1/45 y dilución 1/55. Además, se prueba con una batería de 10 sueros de título escalonado simultáneamente con un antígeno patrón.
 4. PH: 3,6
- Estos análisis son los mismos que se realizan para la evaluación del antígeno de Rosa Bengala producidos por laboratorios privados, nacionales y extranjeros.



Prueba de Rosa Bengla

- Es rápida, económica y fácil de realizar.
- Esta es una prueba sencilla de aglutinación puntual que utiliza antígeno coloreado con rosa de bengala y tamponado a pH bajo, normalmente a $3,65 \pm 0,05$ (Morgan et al., 1969).
- La acidez convierte los anticuerpos no aglutinantes en anticuerpos aglutinantes, por lo que se detectan bajos niveles de IgM e IgA y en su mayoría IgG.
- Además estas pruebas no se ven afectadas por los anticuerpos bloqueantes.
- No distingue entre infecciones con cepa de campo o vacunal con Cepa 19 (en los primeros meses de posterior a la vacunación).
- La prueba de Rosa Bengala tiene una Sensibilidad diagnóstica que está entre 96.2 a 98.7% y una especificidad diagnóstica de 85 a 97.2%.

Envío y conservación de muestras

- Muestra de SANGRE: Tubo sin anticoagulante, actualmente se utilizan con activador de coágulo.
- Enviar refrigerada.
- Nunca congelar muestra de sangre.
- No procesar muestras hemolizadas.
- Muestras bien identificadas.
- Las muestras de SUERO se conservan en freezer, sin coágulo, bien identificadas.

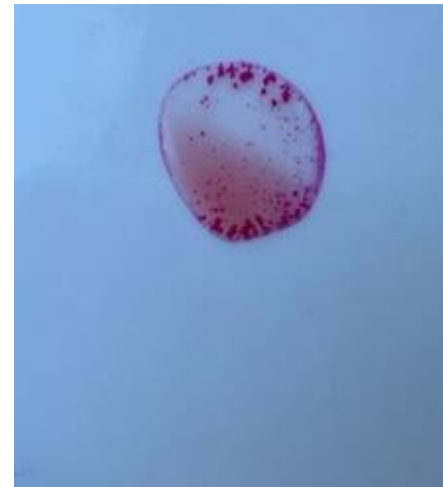
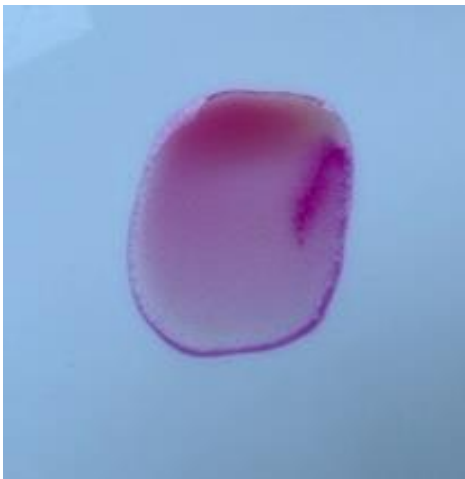
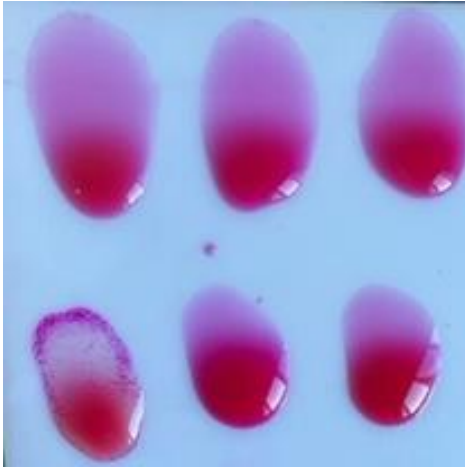
Prueba de Rosa Bengla

1. El suero y el antígeno deben estar a temperatura ambiente, se sacan de la heladera 40 minutos antes ($22 \pm 4^{\circ}\text{C}$).
2. Se depositan 30 μl de cada muestra de suero sobre una placa blanca.
3. Se agita bien el frasco de antígeno, pero suavemente, y se deposita 30 μl del mismo.
4. Se mezclan cuidadosamente el suero y el antígeno (usando una varilla de vidrio) hasta producir una zona circular u oval de aproximadamente 2 cm diámetro.
5. La mezcla se agita suavemente durante 4 minutos a temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$) en un agitador.
6. Se comprueba la aglutinación justo a los 4 minutos.
7. Resultado:
 - Cualquier reacción de aglutinación visible se considera positiva.
 - Es negativo cuando no se evidencia ninguna aglutinación, permaneciendo homogénea la mezcla.
8. Debe analizarse un suero control que dé una reacción positiva mínima antes de comenzar las pruebas de cada día para comprobar la sensibilidad de las condiciones de la prueba.

Prueba de Rosa Bengala



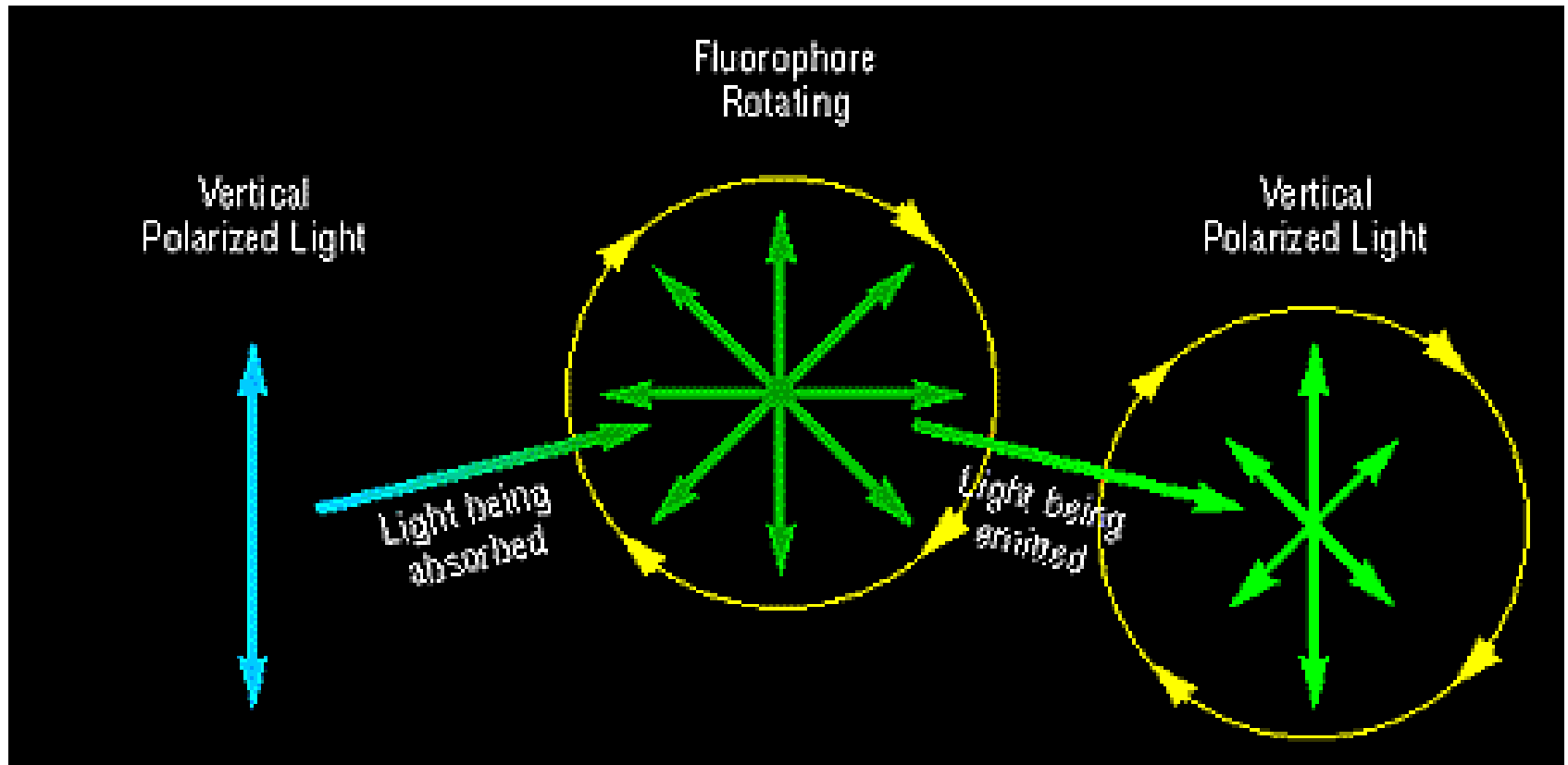
Prueba de Rosa Bengala



Polarización Fluorescente

- Se basa en la medición mediante una luz fluorescente polarizada de la velocidad de rotación de una molécula marcada (que depende de su tamaño).
- Cuando se forma el complejo antígeno-anticuerpo el tamaño de la molécula resultante de esta unión es mayor que la del antígeno (menor de 50Kda si no existen anticuerpos en la muestra estudiada) por lo que la unión antígeno-anticuerpo se traduce en una disminución en la velocidad de rotación de la molécula.
- Se utiliza moléculas del núcleo-O-polisacárido obtenidas por hidrólisis ácida de las células B. abortus 1119 seguida de la precipitación con ácido tricloroacético. Esta preparación se trata con NaOH, se marca con isocianato de fluoresceína y se fracciona (Lin y Nielsen, 1997).
- IgM, IgA e IgG.

Ensayo de Polarización Fluorescente



Ensayo de Polarización Fluorescente (PFA)

- Prueba rápida y que sirve para detectar la infección por *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* en ganado bovino, ovino, caprino y porcino (Nielsen y Gall, 2001)
- La muestra de partida puede ser suero, sangre o leche (Nielsen y Gall, 2001).
- La temperatura de los reactivos empleados en la prueba así como la temperatura a la que tiene lugar la reacción es un importante factor que puede afectar a los resultados y, por tanto, debe ser controlado (Minas et al., 2007).
- En estudios comparativos con otras técnicas serológicas empleadas en el diagnóstico se ha observado que posee al menos la misma eficiencia en el diagnóstico de brucelosis en rumiantes que las herramientas tradicionales (Nielsen et al., 2004), o incluso mayor (Minas et al., 2005).

- Sensibilidad y especificidad diagnóstica = Sensibilidad 95,2 % y Especificidad 99,1 % (McGiven et al, 2003).
- Otros autores han destacado la posibilidad que ofrece esta prueba de acomodar el umbral de positividad en función de la situación epidemiológica donde se aplique (Ramírez-Pfeiffer et al., 2007).
- Puede ser utilizada como prueba para el comercio internacional siendo validada mediante técnicas apropiadas de referencia, estableciéndose los puntos de corte adecuados (OMSA, 2018).

Características intrínsecas y extrínsecas de las pruebas diagnósticas

Tabla 1. Representación de resultados positivos y negativos		
	Enfermos	Sanos
Positivos	Verdaderos positivos	Falsos positivos
Negativos	Falsos negativos	Verdaderos negativos

- Todas las pruebas diagnósticas son imperfectas. Todas fallan en alguna ocasión, en un sentido y en otro.
- Cuando realizamos una prueba a un enfermo esperamos obtener un resultado positivo verdadero (VP), pero siempre habrá algunos casos en los que obtendremos negativos aunque sean enfermos: son los falsos negativos (FN). Y lo mismo ocurre con los sanos, en los que tendremos verdaderos negativos (VN) y falsos positivos (FP).
- Por eso necesitamos conocer bien las características de las pruebas diagnósticas para apoyar en ellas nuestras decisiones clínicas.

- La Sensibilidad es la probabilidad de que la prueba clasifique correctamente a los enfermos o, dicho de otro modo, la probabilidad de que el enfermo sea positivo. Se calcula dividiendo los VP por el número total de enfermos.
- La Especificidad es la probabilidad de que se clasifique correctamente a los sanos o, dicho de otro modo, de que los sanos tengan un resultado negativo. Se calcula dividiendo los VN entre el número de sanos.

Valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN).

- El VPP es la probabilidad de que un animal positivo esté enfermo y se calcula dividiendo el número de enfermos con prueba positiva entre el número total de positivos.
- El VPN es la probabilidad de que un animal negativo esté realmente sano y es el cociente de sanos con resultado negativo entre el número total de negativos.

Tabla 2. Ejemplo de cálculo de las características de las pruebas diagnósticas

	Enfermos	Sanos	
Positivos	428	18	446
Negativos	92	1060	1152
	520	1078	1598

$S = \text{Enfermos positivos} / \text{Enfermos} = 428 / 520 = 0,82$

$E = \text{Sanos negativos} / \text{Sanos} = 1060 / 1078 = 0,98$

$VPP = \text{Enfermos positivos} / \text{Positivos} = 428 / 446 = 0,96$

$VPN = \text{Sanos negativos} / \text{Negativos} = 1060 / 1152 = 0,92$



Enfoques alternativos

Genotipificación de aislamientos de *Brucella abortus* en Uruguay

- Contar con métodos de tipificación que tengan la resolución suficiente para permitir un seguimiento epidemiológico de los brotes de brucelosis y de los programas de control de la enfermedad.
- Estas herramientas pueden adaptarse para estudiar brotes, distribución geográfica y nuevos agentes emergentes.
- Nuevos enfoques : Con el crecimiento del uso de las aplicaciones de NGS, los costos se reducirán sustancialmente y, finalmente, la relación costo/beneficio podría alcanzar un umbral que permita que la detección de cfDNA sea rentable.
- Esto es especialmente importante en el caso de la brucelosis, considerando los efectos económicos de la FPSR.



Enfoques alternativos

Secuenciación a partir de WGS de aislamientos locales de *Brucella abortus* en Uruguay

- Validación de extracción de ADN para diferentes matrices sangre y tejidos.
- Secuenciación de genoma completo 10 aislamientos de 7 focos y metagenómica de 16S de 40 muestras de sangre y tejidos.
- MiSeq™ System – Illumina.

La secuenciación **Metagenómica 16s** consiste en secuenciar productos de PCR obtenidos de regiones específicas (V3-V4) del ADN ribosomal en una bacteria o una composición de múltiples bacterias.

Metagenómica 16S: muestra de sangre bovino

Kingdom	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Bifidobacteriales	Bifidobacteriaceae	Bifidobacterium	
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	Bradyrhizobium	
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	Rhodopseudomonas	
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae		
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Brucellaceae		<i>Secuencia de Brucella</i>
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Brucellaceae	Ochrobactrum	
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Brucellaceae	Pseudochrobactrum	
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Ralstonia	Ralstonia_mannitolilytica(AJ)
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Ralstonia	
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Limnobacter	Limnobacter_thiooxidans(AJ)
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Burkholderia	
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Ralstonia	Ralstonia_pickettii(AY741342)
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Lautropia	Lautropia_mirabilis(HF55838)
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae		
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Burkholderia	Burkholderia_sp.(KJ400396)
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Burkholderia	Burkholderia_sacchari(AF26)
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Burkholderia	Burkholderia_concitans(NR_)
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Burkholderia	Burkholderia_soli(DQ465451)
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Polynucleobacter	Polynucleobacter_necessarius
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Burkholderia	Burkholderia_stabilis(AF097)
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Cupriavidus	Cupriavidus_respiraculi(AF50)
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Burkholderia	Burkholderia_vietnamiensis(NR_)
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Burkholderia	Burkholderia_ultramafica(NR_)
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiales_incertae_sedis	Aquabacterium	Aquabacterium_parvum(AF0)
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiales_incertae_sedis	Aquabacterium	Aquabacterium_olei(NR_137)
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiales_incertae_sedis	Aquabacterium	Aquabacterium_communale(AF0)
Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiales_incertae_sedis	Aquabacterium	



Ministerio
de Ganadería,
Agricultura y Pesca



Muchas gracias