

EVALUACION DE LA PRUEBA MODIFICADA DE ANILLO EN LECHE PARA EL DIAGNOSTICO DE *Brucella melitensis* EN CAPRINOS Y EFECTO DE LA MASTITIS SOBRE LA PRUEBA ^a

Francisco Velázquez Quezada b
Laura Hernández Andrade b
Efrén Díaz Aparicio b,c

RESUMEN

Se efectuó un experimento con cabras de diferentes hatos, con los objetivos de determinar la sensibilidad y especificidad relativa de la Prueba Modificada de Anillo en Leche (PMAL), y evaluar el efecto de la mastitis sobre los resultados de la prueba. Se tomaron muestras de leche y suero sanguíneo a 162 cabras. En la leche se efectuaron las pruebas PMAL, de Wisconsin modificada (PWM), así como el estudio bacteriológico. La leche se sembró en medio selectivo de Farrell para el aislamiento de *Brucella* y en agar sangre, para el aislamiento de microorganismos causantes de mastitis. Las cepas aisladas se identificaron mediante pruebas bioquímicas. A los sueros se les efectuaron las Pruebas de Tarjeta (PT) y de fijación de complemento (F C). Sólo se consiguieron dos aislamientos de cepas de campo de *Brucella melitensis* biotipo I, por lo que, se obtuvo la sensibilidad y la especificidad relativas se obtuvo empleando la FC como prueba de referencia. Se encontró una sensibilidad relativa de 69% y una especificidad relativa de 85 %. Se aislaron 65 cepas de bacterias causantes de mastitis, a las que se efectuó una prueba de aglutinación con suero hiperinmune de conejo anti-*Brucella melitensis*; solamente fueron positivas 10, lo que representa el 15.3 %. Entre las pruebas de mastitis hubo discrepancia en el número de aislamientos (65) y el número de cabras con mastitis subclínica, debido a que en algunas leches se aisló más de una cepa. Se concluye que la prueba tiene baja sensibilidad comparada con FC, y que la mastitis no influye de manera determinante en la aparición de falsos positivos, presentando una buena especificidad.

PALABRAS CLAVE: Brucelosis, Anillo en leche, *Brucella melitensis*, Caprinos, Mastitis.

Téc. Pecu. Méx. Vol 35. No. 1 (1997)

La zoonosis producida por *Brucella* se encuentra muy diseminada en todo el planeta; son pocos los países que la han erradicado, entre los que lo han logrado se encuentran Suecia (1), Israel (2) y Australia (3). Se ha reconocido la eficacia de la prueba de anillo en leche (PAL) para lograr el control de la enfermedad en bovinos (1,2). Desafortunadamente, la prueba no ha funcionado igual en caprinos (4,5). En un trabajo anterior (6), al estandarizar la PMAL para el diagnóstico de brucelosis en caprinos, se encontró un alto número de resultados falsos positivos; además, no existen datos sobre la sensibilidad y especificidad de la prueba, como tampoco

sobre la influencia de la mastitis en el resultado de la prueba.

En estudios realizados para conocer la etiología de la mastitis en cabras, se ha encontrado que los agentes más frecuentes son los *Staphylococcus* coagulasa negativos y coagulasa positivos (7). Entre las especies de *Staphylococcus* están: *S caprae*, *S xylosus*, *S epidermidis*, *S chromogenes*, *S haemolyticus*, *S cohnii*, *S auricularis*, *S aureus* y *S hycus* (7,8,9). Las Corinebacterias son el segundo grupo más prevalente y entre las menos frecuentes están las bacterias Gram negativas, *Mycoplasma*, *Streptococcus* y Levaduras (7,8,10). Todas estas bacterias se han asociado ampliamente a mastitis subclínica y clínica (7).

El umbral fisiológico de las células somáticas en los bovinos es ampliamente aceptado, y hay cierto acuerdo en cuanto al número de células somáticas en ovinos, pero

a Recibido para su publicación el 25 de octubre de 1996.

b Proyecto de Brucelosis CENID-Microbiología, INIFAP-SAGAR. Carretera México Toluca Km. 15.5, Col. Palo Alto, D.F. México C.P. 05110.

c Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, Ciudad Universitaria, 04510, México, D.F.

en el caso del ganado caprino, hay confusión respecto al recuento celular somático y todavía no se establece el umbral de células(11) En el caso de las células epiteliales de la cabra, durante el proceso de secreción pierden parte de su citoplasma, aportando partículas celulares a la leche; estas partículas están presentes tanto en la secreción de glándulas mamarias sanas como en las de infectadas (9,11).

Este trabajo se efectuó con los objetivos de determinar la sensibilidad y la especificidad relativa de la PMAL para el diagnóstico de la brucelosis caprina, y para tratar de conocer el efecto de la mastitis en los resultados de la prueba.

Se emplearon 162 cabras de diferentes hatos del estado de Puebla, a las que se les muestreó leche y suero sanguíneo. Las leches se colectaron en tubos estériles en condiciones de asepsia y se les efectuó la PMAL con antígeno de *Brucella abortus* (Lab. de Pronabive). La modificación efectuada en PAL para PMAL consistió en agregar a 1 ml de leche 0.3 ml de cloruro de sodio al 25%, 0.1 ml de crema de vaca negativa a la PAL (la prueba lleva 30 microlitros de antígeno) y el aumento del tiempo de incubación a 2 h en lugar de 1, a 37 C (6). (La PAL consiste en agregar a 1 ml de leche 30 microlitros de antígeno, mezclar e incubar a 37 C durante 1 h.)

Para el estudio bacteriológico se sembraron las leches en medio Farrell para el aislamiento de *Brucella*; se incubaron durante 7 días a 37 C; a las colonias sospechosas se les efectuó tinción de Gram. La identificación se llevó a cabo por su reacción en pruebas bioquímicas como urea, citrato, producción de ácido sulfhídrico, triple azúcar-hierro. Para conocer el biotipo, los aislamientos se probaron con los antisueros A y M, que son antígenos de superficie de las Brucelas lisas. La fagotipificación se realizó con los fagos Wb, Tb, Iz y Rc. Para conocer si las cepas aisladas eran de campo o vacunales, se probaron con penicilina y

estreptomocina, según la técnica descrita por Alton y col.(4).

El estudio bacteriológico general de mastitis caprina se llevó a cabo sembrando las leches en agar sangre e incubando durante 24 h. Las colonias sospechosas fueron identificadas con pruebas bioquímicas como coagulasa en tubo para los *Staphylococcus*, las pruebas bioquímicas fueron realizadas en un microsistema de identificación API G-20, que contiene 17 pruebas bioquímicas (Analytab Products); las demás pruebas de identificación se realizaron según el National Mastitis Council (12).

Para la determinación de mastitis subclínica se empleó la prueba modificada de Wisconsin que consiste en: colocar 3 ml de leche en los tubos especiales para esta prueba, agregar 3 ml de reactivo de California diluido 1:2 con agua destilada, tapar los tubos y mover la gradilla durante 10 segundos, casi hasta posición horizontal, dejar reposar los tubos 15 segundos e invertir la gradilla en posición vertical, dejando que salga la mezcla durante 15 segundos. Regresar la gradilla a la posición normal; hacer la lectura de los ml restantes e interpretar (13).

Con las cepas aisladas de las muestras de cabras con mastitis se efectuaron pruebas de aglutinación con suero hiperinmune de conejo anti-*Brucella melitensis*. El suero hiperinmune de conejo anti-*Brucella melitensis* se obtuvo por inoculación por vía intraperitoneal de una suspensión de *Brucella melitensis* en solución salina fisiológica, a una concentración de 4×10^9 UFC/ml. A las tres semanas se sangró el conejo por punción venosa, para valorar la concentración de anticuerpos por aglutinación en tarjeta (Rosa de Bengala); cuando ésta fue adecuada se sangró en blanco por punción cardíaca(13).

A los sueros se les efectuaron las Pruebas de Tarjeta (PT) y Fijación de Complemento (F C) usando las técnicas descritas por Alton y col. (4).

En el estudio bacteriológico solamente se aislaron dos cepas de campo de *Brucella melitensis* biotipo 1, confirmado por su sensibilidad a estreptomomicina y resistencia a penicilina. En cuanto a fagotipificación no fueron lisadas por los fagos Wb, Tb y Rc, teniendo una lisis parcial con el fago Iz, lo que confirmó la especie aislada. Además, se aislaron 65 cepas de bacterias causantes de mastitis, que se presentan en el Cuadro 1. Los resultados de la prueba PMLA fueron 16 positivas y 117 negativas. En la prueba modificada de Wisconsin se detectaron 60 positiva y 102 negativas a mastitis subclínica. En la prueba serológica de tarjeta (PT) se obtuvieron 23 positivos y 135 negativos.

En la prueba serológica de fijación de complemento (FC) se encontraron 23 positivos y 139 negativos.

Debido a que solamente se consiguieron dos aislamientos de cepas de *Brucella melitensis*, no fue posible calcular la sensibilidad y especificidad absolutas, por lo que se obtuvo la sensibilidad relativa, tomando la FC como prueba de referencia. De 23 animales positivos a FC solamente 16 fueron positivos a anillo en leche, encontrándose 7 falsos positivos, por ser positivos a FC y negativos a PMAL. La sensibilidad de la PMAL fue de 69 %.

En el caso de animales negativos se encontraron 139 a FC, y 117 de estos fueron negativos a PMAL, teniendo 22 falsos negativos por ser negativos a FC y positivos

a PMAL. La especificidad relativa de la prueba de PMAL fue de 85%.

De las cepas aisladas de casos de mastitis, con las que se efectuaron pruebas de aglutinación con suero hiperinmune de conejo anti-*Brucella melitensis*, dieron reacción positiva 6 cepas de *Staphylococcus aureus*, 2 de *Streptococcus* y 2 de *Micrococcus*, dando un total de 10 cepas, que representan el 15.3 % de las cepas aisladas.

En el Cuadro 1, se observa que hubo 65 aislamientos de bacterias causantes de mastitis y en el resultado de la prueba modificada de Wisconsin solamente aparecen 60 positivos a mastitis subclínica. Esta diferencia se explica porque en algunas muestras se aisló más de una cepa por leche estudiada.

La PMAL presenta valores de sensibilidad y especificidad relativos, que al ser comparados con otras pruebas desmerecen mucho (15); sin embargo, no hay que perder de vista que la prueba está contemplada como una prueba «TAMIZ», que nos indica si un hato tiene problemas de brucelosis para que se evalúe individualmente a los animales. En cambio, las pruebas serológicas tienen utilidad y fines diferentes, por lo que la comparación puede no ser tan válida. (15)

El suero hiperinmune es rico en anticuerpos anti-*Brucella*; la cepa bacteriana causante de mastitis correspondería al antígeno que cruza; si no hay reacción cruzada de

CUADRO 1. BACTERIAS CAUSANTES DE MASTITIS AISLADAS DE LECHE DE CABRA.

<i>Staphylococcus</i> spp	19	<i>Bacillus</i> Gram(-)	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	<i>Acinetobacter</i>	2
<i>Staphylococcus auricularis</i>	1	<i>Escherichia coli</i>	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6	<i>Alcaligenes</i>	1
<i>Streptococcus</i>	2	Levaduras	1
Cocos Gram (+)	5	<i>S. sonii</i>	1
<i>Micrococcus</i>	17	<i>Moraxela</i>	1

TOTAL AISLAMIENTOS

65

aglutinación, no está modificando el resultado. El bajo porcentaje de pruebas positivas de aglutinación entre las cepas aisladas de mastitis y el suero hiperinmune de conejo anti-*Brucella melitensis*, hace ver que la influencia de la mastitis bacteriana en el resultado de la PMAL no es determinante.

El uso de la PAL en cabras no es recomendada por la Norma de la Campaña de Erradicación de la Brucelosis (16), esto es debido principalmente a que no existen resultados de trabajos de investigación que soporten el uso de la PAL ni de la PMAL; aunque es deseable contar con una prueba para el diagnóstico de brucelosis a partir de leche de cabras, sea o no la de anillo en leche, ya que no se cuenta con pruebas diagnósticas de amplia cobertura para la vigilancia epidemiológica.

EVALUATION OF THE MODIFIED MILK RING TEST FOR GOAT MILK FOR DIAGNOSIS OF *Brucella melitensis* AND THE EFFECT OF MASTITIS ON THE TEST RESULTS.

SUMMARY.

In order to determine the relative sensibility and specificity of the modified milk ring test (MMRT) for goat milk, and to evaluate the effect of mastitis on the test results, samples of milk and blood were taken from 162 pregnant goats. Milk samples were subjected to MMRT and the modified Wisconsin test for subclinical mastitis. Additionally milk samples were cultivated in selective Farrell's medium to isolate *Brucella*, and in blood agar to isolate mastitis related bacteria. The isolated strains were identified by biochemical tests. Serum samples were analyzed by the Rose Bengal test (RBT) and the complement fixation test (CFT). Only two field strains of *Brucella melitensis* type 1 were isolated. To determine relative sensibility (Rsen) and specificity (Rspe), CFT was used as the reference test. The Rsen was 69% and the Rspe was 85%. Sixty five isolated mastitis related bacteria were examined by an agglutination test against hyperimmune anti-*Brucella melitensis* rabbit serum. There were 10 positive results (15.3%). The conclusion is that the MMRT has a low sensivity in comparison to the CFT and that mastitis doesn't affect the specificity in a significant way.

KEY WORDS: Brucellosis, Milk ring test, *Brucella melitensis*, Goats, Mastitis

REFERENCIAS

1. Bjorkman G H B. Eradication of bovine brucellosis in Sweden. J. Am. vet. med. Ass. 1962; 140(11): 1192
2. Dafni I G. Eradication of bovine brucellosis in Israel 1970-1987. Isr. J. vet. med., 1989; 45(4):233
3. Anónimo. Technical report. Standardized Complement Fixation Test for Bovine Brucellosis. Australian Veterinary Journal, vol 5, Aug. 1977, p 395-400
4. Alton G G, Jones M L, Angus D R, Verger M J. Techniques for the brucellosis laboratory. Institute National de la Recherche Agronomique, Paris 1988: 131
5. Abd-El-Gahni, Osman K, Nada S M. Evaluation of serodiagnostic methods for brucellosis among sheep and goats in Egypt. Int. J. Zool. Biol. (2): 112
6. Mancera M A, Velázquez O R, Aracelis N J, Suárez G F, Córdova L D, Díaz A E, Nájera E D. Respuesta humoral en cabras vacunadas contra *Brucella melitensis* usando la prueba de anillo en leche modificada y diferentes pruebas serológicas. Tesis de Maestría. (Impresa)
7. Corrales J C, Sánchez A, Ferrer M, Masera C, Contreras A. Relationship between mastitis cell counts and intramammary pathogens in goats. International Symposium: "Somatotropic control of small ruminants" Bella Italia, 1994.
8. Corrales J C, Sierra M, Sánchez L A, Contreras A. Dominancia de estafilococos coquebacterias en la etiología de las mastitis clínicas caprinas. XVIII Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Lucete, España 1993.
9. Poutrel B. Les maladies de chèvre. Les colloques de l'INRA, les maladies de chèvre (goat diseases). Niort France, 1988: 28-109
10. Dulin A M, Paape M J, Schaefer M D, Weinland B T. Effect of parity, stage of lactation and intramammary infection on concentration of somatic cells and cytoplasmic particles in goats milk. J. Dairy Sci. 1995; 78: 2426.
11. Gonzalo C, Marino J, Ferrer M, Contreras M C, García F, Rota A, Contreras A. Field situation of sec in milk of small ruminants in Spain. International Symposium: "Somatotropic control of small ruminants" Bella Italia, 1994.
12. National Mastitis Council. Field Book on Bovine Mastitis. Inc. 1989
13. Pérez D M. Manual sobre ganado lechero. Ed. México: Diana, 1984.
14. Comité Mixto FAO/OMS de expertos en brucelosis. Quinto Informe. Ginebra, 1970: 36
15. Díaz Aparicio E y col. Evaluation of Serological Test for diagnosis of *Brucella melitensis* infection of goat. J. clin. Micro.; 1994; 32: 1159
16. Norma Oficial Mexicana NOM-041-200-1995. Diario Oficial de la Federación 20 de agosto de 1996.