

Diagnóstico de brucelosis de ganado bovino nativo del Norte de México con cultivo de muestras de leche, seroaglutinación con rosa de bengala y rivanol según la NOM-041-ZOO-1995

Diagnosis of brucellosis in native cattle of Northern of Mexico with culture of milk samples, seroagglutination with rose bengal and rivanol according to the NOM-041-ZOO-1995

DOI: 10.34188/bjaerv5n2-009

Recebimento dos originais: 20/01/2022

Aceitação para publicação: 31/03/2022

Esteban Neftalí Portillo Soto

Ingeniero Bioquímico por la Universidad Autónoma de Coahuila; Maestro en Ciencias Químicas por la Universidad Juárez del Estado de Durango

Institución: Universidad Juárez del Estado de Durango, Facultad de Ciencias Químicas, Unidad Gómez Palacio

Dirección: Avenida 123 s/n Fraccionamiento Filadelfia, Gómez Palacio, Durango, México

E-mail: ibq.neftali@gmail.com

Aurora Martínez Romero

Doctora en Ciencias Agropecuarias por la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro
Institución: Universidad Juárez del Estado de Durango, Facultad de Ciencias Químicas, Unidad Gómez Palacio

Dirección: Avenida 123 s/n Fraccionamiento Filadelfia, Gómez Palacio, Durango, México

E-mail: auroramtzr@gmail.com

José Luis Ortega Sánchez

Doctor en Educación por la Universidad Autónoma de Coahuila
Institución: Universidad Autónoma Chapingo, Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas
Dirección: Bermejillo, Durango

E-mail: joeortega899@gmail.com

Jesús Eduardo Luna Martínez

Maestro en Ciencias Veterinarias por la Universidad Nacional Autónoma de México

Institución: Centro de Investigación y Diagnóstico en Salud Animal (CIDSA)

Dirección: Calzada Ávila Camacho Torreón, Coahuila

E-mail: eduardoluna@hotmail.com

Mary Carmen Torres Contreras

Ingeniero Bioquímico por la Universidad Autónoma de Coahuila
Institución: Centro de Investigación y Diagnóstico en Salud Animal (CIDSA)

Dirección: Calzada Ávila Camacho Torreón, Coahuila

E-mail: ibq_mctc@hotmail.com

Maribel Cervantes-Flores

Doctora en Inmunología por la Universidad Nacional Autónoma de México
Institución: Universidad Juárez del Estado de Durango, Facultad de Ciencias Químicas, Unidad Durango

Dirección: Avenida Veterinaria s/n, Circuito Universitario, Colonia Valle del Sur, Durango, México

E-mail: mcf_di@yahoo.com.mx

José de Jesús Alba-Romero

Doctor en Ciencias Biomédicas por la Universidad Juárez del Estado de Durango
Institución: Universidad Juárez del Estado de Durango, Facultad de Ciencias Químicas, Gómez Palacio

Dirección: Avenida 123 s/n Fraccionamiento Filadelfia, Gómez Palacio, Durango, México

E-mail: jalbar_2021@hotmail.com

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue realizar el diagnóstico de brucelosis de ganado bovino nativo del Norte de México con cultivo de muestras de leche, seroaglutinación con rosa de bengala y rivanol según la NOM-041-ZOO-1995. Se seleccionó una población de 1600 bovinos hembra adultos lecheros raza Holstein-Friesian de 38 a 48 meses de edad. Cada muestra estuvo compuesta de leche extraída proveniente de todos los cuarterones, tomándose ~10 mL de leche por cada pezón. Sembradas en TSA/5% SBE y 5% CO₂ atm, 37°C/21 d, subcultivos en agar *Brucella* y agar TSI 37°C/21 d y pruebas bioquímicas para detectar la producción de H₂S y ureasa, y así confirmar la identificación de *Brucella*. El suero obtenido fue para procesar rosa de bengala y rivanol. Resulto un total de 460 cultivos de leche positivo a *Brucella* spp, de las cuales 417 (90.65%) fueron positivas a rosa de bengala y 43 (9.35%) negativas. Al procesar rivanol, fueron 338 (73.48%) positivas y 122 (26.52%). Rivanol sigue siendo buen referente para diagnóstico de brucelosis por infección, ya que permite descartar tanto muestras positivas por cultivo positivo en leche como por el diagnóstico en suero con rosa de bengala.

Palabras clave: *Brucella abortus*, salud pública, rivanol.

ABSTRACT

The objective of this research was to make the diagnosis of brucellosis in native cattle of Northern of Mexico with culture of milk samples, seroagglutination with rose bengal and rivanol according to NOM-041-ZOO-1995. A population of 1600 adult female Holstein-Friesian dairy cattle between 38 and 48 months of age was selected. Each sample consisted of expressed milk from all quarters, taking ~ 10 mL of milk for each teat. Seeded in TSA/5% SBE and 5% CO₂ atm, 37°C/21 d, subcultures in *Brucella* agar and TSI agar 37°C/21 d and biochemical tests to detect the production of H₂S and urease, and thus confirm the identification of *Brucella*. The serum obtained was to process rose bengal and rivanol. A total of 460 milk cultures were positive for *Brucella* spp, of which 417 (90.65%) were positive for rose bengal and 43 (9.35%) were negative. When processing rivanol, they were 338 (73.48%) positive and 122 (26.52%). Rivanol continues to be a good reference for the diagnosis of brucellosis due to infection, since it allows to discard both positive samples by positive culture in milk and by the diagnosis in serum with rose bengal.

Keywords: *Brucella abortus*, public health, rivanol.

1 INTRODUCCIÓN

La brucelosis es de las zoonosis bacterianas más frecuentes en todo el mundo (Legesse *et al.*, 2018). Al ser capaz de afectar al animal y al hombre, se considera una antropozoonosis, ya que su agente etiológico hospedado por algunos animales es transmisible a la especie humana. En humanos, puede presentar formas agudas y latentes (Cavalcanti-Soares *et al.* 2015). El género *Brucella* infecta a animales de granja, bovinos, ovinos, caprinos y cerdos (Lou *et al.*, 2018). Sigue siendo un problema de salud pública, especialmente en comunidades rurales (Koyuncu *et al.*, 2018). Se encuentra en América Latina, región del Mediterráneo en Europa, oeste de Asia y en territorio africano. Esta enfermedad es causada por bacterias del género *Brucella*, Gram (-), intracelular facultativo (Cloekaert *et al.*, 2020). La cual puede transmitirse de los caprinos al hombre. Enfermedad que tiene diversas sinonimias, Fiebre Malta, Mediterránea u Ondulante (Wang *et al.*, 2020). La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa de curso crónico que incide negativamente en la salud afectando al hombre y animales domésticos, fauna silvestre y mamíferos marinos (Miceli *et al.*, 2019). Ocasionando cuantiosas pérdidas económicas al sector ganadero (Cutiño y López, 2020). Debido principalmente a abortos en el último tercio de la gestación, disminución en producción de leche, desecho anticipado del hato, nacimiento de becerras débiles aparentemente normales, positivas a *Brucella abortus* (Carrisoza-Urbina *et al.*, 2014). *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* son las especies más virulentas en orden de patogenicidad para el hombre (Sadeghi *et al.*, 2020). Desde la priorización de la brucelosis en 2017, se han realizado esfuerzos para desarrollar una estrategia de control (Sambu *et al.*, 2020). El conocimiento de la propagación y la prevalencia de la brucelosis es esencial para tomar medidas de control (Díaz-Herrera 2015). Estos organismos pueden sobrevivir y propagarse por medio de alimentos y agua (Carrisoza-Urbina *et al.*, 2014). Debido a su gran capacidad adaptativa para evadir los mecanismos inmunológicos, es una infección de difícil tratamiento, a pesar de no desarrollar evidencia de resistencia al manejo antibiótico establecido (Rodríguez *et al.*, 2014). La OMS considera que la brucelosis tiene serias implicaciones para la salud, particularmente en segmentos menos favorecidos de la población y en regiones con insuficiente atención sanitaria. *Brucella* puede infectar a múltiples huéspedes, como al humano, animales de granja como ganado bovino, ovino, caprino y porcino (Pelerito *et al.*, 2020). La prevención de la enfermedad en el ser humano está relacionada al control de animales positivos, además de cuidados con alimentos y con el contacto con fuentes de contaminación (Torres-Higuera *et al.*, 2018). La brucelosis impacta de manera perjudicial a la salud humana y animal, reflejándose en el sector pecuario como grandes pérdidas económicas debido a los abortos, esterilidad y la disminución del rendimiento fisiológico que presentan los animales infectados, mientras que en el sector sociosanitario el contacto con animales enfermos. El consumo de productos cárnicos y lácteos

contaminados diseminan la enfermedad entre la población humana, causando un cuadro clínico inespecífico que puede generar enfermedades como: artritis, endocarditis, meningitis y osteomielitis, por mencionar las más comunes. Por lo que el objetivo fue realizar el diagnóstico de brucelosis de ganado bovino nativo del Norte de México con cultivo de muestras de leche, seroaglutinación con rosa de bengala y rivanol según la NOM-041-ZOO-1995.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio transversal, analítico, comparativo y observacional. Se llevó a cabo en las instalaciones de la FCQ, y en los laboratorios del Centro de Investigación y Diagnóstico en Salud Animal (CIDSA) del Comité de Campaña de la Erradicación de la Tuberculosis Bovina y Brucelosis de la Región Lagunera de Coahuila y Durango, Asociación Civil. A partir del universo que concierne bovinos nativos de la Comarca Lagunera, se seleccionó por casuística a una población de 1600 bovinos hembra adultos lecheros raza Holstein-Friesian de 38 a 48 meses de edad que hubiesen sido inmunizados contra brucelosis sólo con la vacuna RB51 cuya aplicación se haya efectuado en un lapso ≥ 12 meses. Las muestras tomadas de cada unidad experimental fueron leche directamente de la ubre y sangre tomada a través de la vena coccígea, y se transportaron al CIDSA, donde se procesó para obtención y resguardo de leche y suero bajo congelamiento.

Toma, transporte y cultivo de muestras

Según la OIE (2018), las muestras de leche se recogieron asépticamente después de realizar un lavado y secado de la ubre, así como previa desinfección de pezones utilizando agua tibia con jabón. Cada muestra estuvo compuesta de leche extraída proveniente de todos los cuarterones, el primer chorro de leche fue descartado (despunte) tomándose ~ 10 mL de leche por cada pezón. Asimismo, el par de guantes empleados por el personal ordeñador antes de la recolección de leche de cada animal se desinfectó con una solución de alcohol 70% para evitar contaminación cruzada. Después de la toma de cada muestra, se depositaron en hieleras previamente enfriadas con compresas de gel congeladas (4 a 10°C). Centrifugadas y sembradas por técnica de estriado en cajas Petri de vidrio con medio selectivo sólido agar soja-tripticosa (TSA/5% suero fetal bovino (SBE) y 5% CO₂ atm), la caja Petri se seccionó en dos partes, una para la crema y otra para la parte que sedimentó de la muestra después de haber sido sometida a centrifugación. Posteriormente, se incubaron a 37°C/21 d, se realizaron subcultivos en agar *Brucella* y agar TSI a todos aquellos cultivos que dieron un crecimiento bacteriológico positivo consistente con *Brucella* spp 37°C/21 d y al obtener un segundo crecimiento en ambos medios de subcultivo, se realizaron pruebas bioquímicas para detectar la producción de H₂S (papel con acetato de plomo) y ureasa (método de

Christensen), y así confirmar la identificación de *Brucella*. Por otro lado, se consideraron como muestras negativas a *Brucella* spp todos aquellos cultivos que durante el lapso establecido no presentaron crecimiento.

Procedimiento para la **prueba Rosa de Bengala (RBT)** Reg. SAGARPA: B-0653-009 Aba Test Tarjeta 8% Uso Veterinario PRONABIVE®.

En un recipiente se agregó 1 L de agua corriente y 5 mL de cloro concentrado (para las puntillas desechadas). Se encendió el aglutinoscopio verificando que la luz blanca fuera constante y que la lámpara no presente ninguna anomalía. Se colocaron 30 µL de suero problema en cada uno de los cuadrantes de la placa de vidrio de reacciones febriles con 30 µL de antígeno RBT, manteniendo entre ambas alícuotas depositadas una distancia intermedia de ~1 cm en cada uno de los cuadrantes. Se mezcló en forma circular el suero problema con el antígeno utilizando un aplicador de madera. Después a un agitador universal de rotación (oscilador) y se dejó reposando la placa durante 4 min; se registró el tiempo en el cronómetro y fueron observados en el aglutinoscopio, para interpretación de resultados. La placa se lavó con texatrón neutro diluido al 25%. Se procedió a desinfectar con 5 mL del desinfectante (Benzal, etanol al 70%, y cloro).

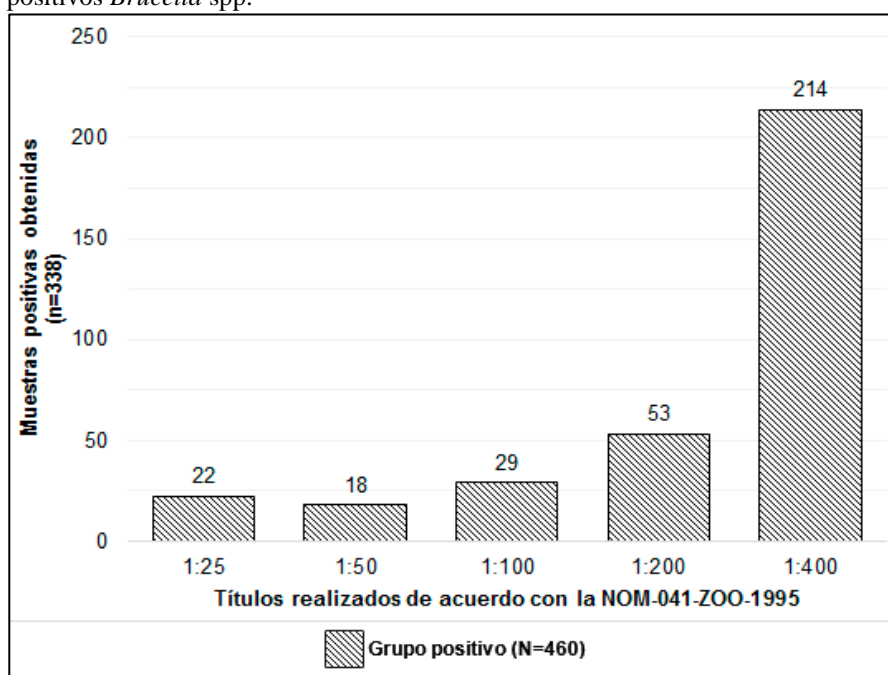
Procedimiento para la **prueba Rivanol (RIV)** en placa. Reg. SAGARPA: B-0653-019. Uso Veterinario PRONABIVE® Lote No. 4020289-1

Los tubos Vacutainer® nuevos fueron rotulados con el número de identificación correspondiente a cada microtubo con muestra serológica, utilizándose un marcador indeleble de color negro para este propósito. Se agregaron 400 µL de cada suero problema en los tubos Vacutainer® correspondientes. Posteriormente, 400 µL de solución de Rivanol® en cada tubo, obteniéndose un volumen total de 800 µL, dejando en reposo 20 min, se centrifugo a 2,000 g por 5 min. Empleando 5 cuadrantes por muestra, en una placa de vidrio, se colocaron 80, 40, 20, 10 y 5 µL, se agregó 30 µL de antígeno RIV. Se mezcló aplicador y se colocó la placa en el agitador universal a velocidad media (15 rpm; Hold-on) 12 min. Se observaron e interpretaron resultados (toda muestra que presentó aglutinación a cualquiera de los títulos 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 y 1:400 se considera positiva). Con la respectiva desinfección de la placa y área de trabajo.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 1,600 muestras analizadas se tomó de cada unidad experimental muestra de leche y muestra sanguínea para obtención de suero, resultando un total de 460 cultivos de leche positivo a *Brucella* spp, asimismo, las muestras de suero trabajadas fueron sus precedentes. De las cuales 417 (90.65%) fueron positivas a RBT y 43 (9.35%) negativas. Al procesar RIV, fueron 338 (73.48%) positivas y 122 (26.52%) (**Figura 1**).

Figura 1. Resultados obtenidos de la prueba RIV clasificados de acuerdo con el título de seroaglutinación, de 460 cultivos de leche positivos *Brucella* spp.



La RBT es una prueba sencilla, cualitativa que permite identificar la presencia de la brucelosis y con ello poder identificar los sueros positivos que son el caso de nuestra investigación; se sigue utilizando como prueba diagnóstica para brucelosis (Assenga *et al.*, 2015; Purwar *et al.*, 2016); también, por su elevada sensibilidad y especificidad, se ha comparado la RBT con el método molecular en el diagnóstico de brucelosis, es una prueba sencilla que permite identificar sueros positivos como en nuestra investigación; como se pudo observar con la investigación realizada por Cevallos-Falquez y colaboradores (2010), realizaron una técnica de PCR convencional obteniendo un valor de sensibilidad del 75% y una especificidad de 92% en comparación con la RBT. Asimismo, en el año 2017 se analizaron 30 muestras de suero sanguíneo de cabras que dieron positivas empleando la RBT, las cuales también resultaron positivas con las muestras de sangre total con el método PCR múltiple, los resultados de la amplificación de las muestras permitieron observar que ninguna de las muestras con RBT negativas presentaron bandas, es decir fueron Rosa de Bengala negativas, PCR múltiple negativas, con lo que se obtuvo una sensibilidad y especificidad del 100%, por lo que, el VPP y el VPN fueron 100% (Cuevas-Jácquez *et al.*, 2017).

4 CONCLUSIONES

Se realizó el diagnóstico de brucelosis de ganado bovino nativo del Norte de México con cultivo de muestras de leche, seroaglutinación con rosa de bengala y rivanol según la NOM-041-ZOO-1995. El cultivo de leche fue el referente para seleccionar las muestras positivas a brucelosis, descartando por serología con RBT el 9.35%, y por RIV el 26.52%, concluyendo que RIV sigue

siendo buen referente para diagnóstico de brucelosis por infección, ya que permite descartar tanto muestras positivas por cultivo positivo en leche como por el diagnóstico en suero por RBT. De 460 muestras positivas a cultivo de leche, se eliminan como positivas por RIV un 26.56%, la prueba serológica RIV para diagnóstico de brucelosis es buen referente para identificar las muestras positivas por vacunación.

REFERENCIAS

Assenga, J.A., Matemba, L.E., Muller, S.K., Malakalinga, J.J., and R.R. Kazwala. 2015. Epidemiology of *Brucella* infection in the human, livestock and wildlife interface in the Katavi-Rukwa ecosystem, Tanzania. BMC Vet. Res., 11:189.

Carrisoza-Urbina, I., Medina-Cruz, M., Palomares-Reséndiz, E.G., Díaz-Aparicio, E. 2014. Transmisión de *Brucella abortus* en becerras menores de tres meses diagnosticadas por medio de las pruebas de tarjeta e inmunodifusión radial en dos hatos lecheros del estado de Querétaro. Número especial Vet. Mex., 11-18.

Cavalcanti-Soares, C., Almeida-Teles, J., Feitosa-Dos Santos, A., Firmino-Silva, S., Rocha-Andrade Cruz, M., and F. Da Silva-Junior. 2015. Prevalencia de la *Brucella* spp en humanos, Rev. Latino-Am. Enfermagem., 23(5):919-926.

Cevallos-Falquez, O.M., Carranza-Patiño, S., Saucedo-Aguilar, D., Romero-Garaicoa, L., Ramos-Gavilanes, X.,... F. Canchignia-Martínez. 2010. Diagnóstico Serológico (Rosa de Bengala) y Molecular (PCR) de Brucelosis en Humano. Ciencia y Tecnología 3: 27-32.

Cloekaert, A., Vergnaud, G., and M.S. Zygmunt. 2020. Omp2b Porin Alteration in the Course of Evolution of *Brucella* spp. Front. Microbiol., 11:284.

Cuevas-Jacquez, R.A., Ortega-Sánchez, J.L., Cervantes-Flores, M., Pérez-Morales, R., Hernández-González, S.I., Alba-Romero, J.J., and A. Martínez-Romero. 2017. Diagnosis of Caprine Brucellosis by Serology and Multiple PCR. Journal of Agriculture and Veterinary Science, 10(5):82-87.

Cutiño, J.A.M., and G.T. López. 2020. Marcadores moleculares para la taxonomía e identificación del género *Brucella* (Alphaproteobacteria). Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas, 39(1).

Díaz-Herrera D.F., Cruz-Santana Y., and O. Cruz-Sui. 2015. Desarrollo y evaluación del desempeño de una prueba rápida inmunocromatográfica para el diagnóstico de la brucelosis. Rev. Salud Anim., 37(2):105-111.

Koyuncu, I., A. Kocyigit, A. Ozer, S. Selek, A. Kirmit and H. Karsen. 2018. Diagnostic potential of *Brucella melitensis* Rev1 native Omp28 precursor in human brucellosis. Central European Journal of Immunology, 43(1):81-89.

Legesse, M., G. Medhin, M. Bayissa and G. Mamo. 2018. Knowledge and perception of pastoral community members about brucellosis as a cause of abortion in animals and its zoonotic importance in Amibara district, Afar Region, Ethiopia. Plos One, 13(11): e0206457.

Lou, L., W. Bao, X. Liu, H. Song, Y. Wang,... S. Wang 2018. An Autoimmune Disease-Associated Risk Variant in the TNFAIP3 Gene Plays a Protective Role in Brucellosis That Is Mediated by the NF-kappaB Signaling Pathway. J. Clin. Microbiol., 56(4):1-10.

Miceli, G.S., Pérez, M.L., Peralta, L.M., and E.C. Mortola. 2019. Detección de anticuerpos contra *Brucella abortus* en perros en contacto con zona rural. Aspectos zoonóticos de la infección. Analecta Veterinaria, 39(2):8-14.

OIE. 2018. Brucellosis (*Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*) World Organisation For Animal Health (ed.), Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Office International des Epizooties: Paris, France).

Pelerito, A., Nunes, A., Nuncio, M.S., and J.P. Gomes. 2020. Genome-scale approach to study the genetic relatedness among *Brucella melitensis* strains. PLoS One, 15(3):e0229863.

Purwar, S., Metgud, S.C., Mutnal, M.B., Nagamoti, M.B., and Ch.S. Patil. 2016. Utility of Serological Tests in the Era of Molecular Testing for Diagnosis of Human Brucellosis in Endemic Area with Limited Resources. J. Clin. Diagn. Res., 10:26-29.

Rodríguez, Y., Nariño-Torres, S., Jiménez-Mora, J.F., and J.C. Vargas-Charry. 2014. Brucellosis recurrente. Revista Pediatría, 47-2:32-35.

Sadeghi, Z., Fasihi-Ramandi, M., Azizi, M., and S. Bouzari. 2020. Mannosylated chitosan nanoparticles loaded with FliC antigen as a novel vaccine candidate against *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* infection. J. Biotechnol., 310:89-96.

Sambu, R.M., Mathew, C., Nonga, H.E., Lukambagire, A.S., Yapi, R.B., ... R.R. Kazwala. 2020. *Brucella* species circulating in wildlife in Serengeti ecosystem, Tanzania.

Torres-Higuera L.D., Jiménez-Velásquez S.C., Rodríguez-Bautista J.L., and R.E. Patiño-Burbano. 2018. Identification of *Brucella abortus* biovar 4 of bovine origin in Colombia. Rev. Argent. Microbiol., 51(3):221-228.

Wang, H., Hoffman, C., Yang, X., Clapp, B., and D.W. Pascual. 2020. Targeting resident memory T cell immunity culminates in pulmonary and systemic protection against *Brucella* infection. PLoS Pathog., 16(1):e1008176.