

Estudio Comparativo de Diferentes Técnicas Serológicas para el Diagnóstico de la Brucelosis en Cerdos

CARLOS ROBERTO PINEL R.¹

INTRODUCCION

Revisando la literatura, encontramos mucho escrito sobre la brucelosis, una de las principales zoonosis que quebranta la salud del hombre y menoscaba la economía pecuaria; más, en el terreno práctico, a esta enfermedad no se le ha prestado la atención merecida. Acumular aunque someramente las pérdidas que ocasiona por esterilidad y aborto en cerdos, nos coloca frente a un problema de gran envergadura, en cuya resolución el médico veterinario desempeña un papel importante; ya que es él quien está en relación más directa con los animales hospedadores del agente causal, y sus actividades profesionales lo sitúan en lugar privilegiado para hacer el diagnóstico y dictar las medidas correspondientes para su control y erradicación.

Son numerosos los métodos de laboratorio que se emplean para el diagnóstico de la brucelosis tanto en el hombre como en los animales. Entre éstos métodos, es notorio que las técnicas de aglutinación son las de mayor uso práctico y de gran valor diagnóstico para determinar la infección en piaras, pero también, con grandes limitaciones y de escaso valor para el diagnóstico individual en cerdos (3, 9, 10, 11, 13, 15), ya que, mientras de algunos animales que han reaccionado con títulos de 1:100 o más altos no se ha aislado *Brucellas*, éstas si han sido recuperadas de animales cuyos sueros no han aglutinado o lo han hecho a títulos muy bajos; esto aun cuando no siempre sucede así, le resta precisión a la prueba.

La técnica de fijación en superficie de Castañeda (3), es un método nuevo de laboratorio que se emplea en la rutina serológica para el diagnóstico de la brucelosis en el hombre; habiéndose aplicado también a ciertas especies animales, en especial bóvidos (3, 5), con magníficos resultados; también han sido significativos los obtenidos por Caldas y Machado (6, 7) en cerdos, que sugieren el empleo de esta

1. Profesor Asistente de Veterinaria, Médico Veterinario, Departamento de Industria Animal, Escuela Agrícola Panamericana.

2. Patentizo mi agradecimiento al personal del Centro de Investigaciones Médicas del Hospital General de México, D. F., México, por su benévola cooperación para el desarrollo de este trabajo.

prueba como método de diagnóstico individual, dada su ejecución rápida y fácil, muy práctica, con gran especificidad y marcada sensibilidad, comparada con el método de tubo.

Es importante subrayar que, Castañeda (4, 5) atribuye poca especificidad a las técnicas de aglutinación, por ser influenciadas por fenómenos de prozona o de bloqueo, aunque Berthelon (1), sostiene que la prueba de placa no es influenciada por este tipo de fenómenos, y Renoux (16) asienta que la prueba de fijación en superficie es menos sensible que la de aglutinación en tubo. Todos estos factores propician una notable discrepancia en los criterios sobre la interpretación de las mismas.

Precisamente, esa divergencia de criterios en lo que respecta al empleo de una técnica que reúna las ventajas para realizar un diagnóstico más exacto, me indujo a abordar el tema y desarrollar este trabajo de estudio comparativo de tres de las técnicas serológicas de mayor uso práctico en la rutina de diagnóstico de la brucelosis: aglutinación en placa (reacción de Huddleson); aglutinación en tubo (Wright) y fijación en superficie (Castañeda), para analizar el comportamiento de cada una de ellas comparándolas entre sí. No obstante ser ajustada la prueba de placa a la de tubo, la incluimos en nuestro estudio por ser de distinta procedencia los antígenos empleados.

Desde luego debemos recordar, que no hay medio más exacto para el diagnóstico que el aislamiento e identificación del germen; en esta situación, el estudio comparativo de estas técnicas hubieran sido más exactos si se hubieran verificado los resultados por medio del aislamiento de *Brucellas* del torrente sanguíneo o de aquellos tejidos de los cerdos por los cuales tiene predilección dicho agente infeccioso; pero en nuestras condiciones de trabajo era prácticamente imposible, ya que los cerdos son sacrificados en serie, y el resto del proceso hasta la obtención de la canal, hace completamente imposible la identificación del sujeto. Esto sería factible, destinando un lote de cerdos para realizar dicha investigación, que corresponderá a otros que fijen su interés en este tipo de trabajo y dispongan de las facilidades para el caso.

MATERIAL Y METODOS

Para el desarrollo de este trabajo fueron empleados 2.500 sueros, correspondientes a un número igual de cerdos que fueron sacrificados en el rastro del D. F. Las muestras fueron tomadas en el momento del degüello de los cerdos, correspondiendo 10 ml. aproximadamente a cada muestra. Se esperó un tiempo para la formación del coágulo y producción de suero, el cual fue separado por decantación y transvasado a frascos estériles de 20 ml. de capacidad. Se les practicó la prueba de placa, después de trabajados se les agregaba merthiolato como conservador y fueron sometidos a congelación, ya que este método se considera ideal para evitar la alteración de los títulos (18). En cada prueba trabajamos 100 muestras. De los sueros almacenados fueron seleccionados por volumen 225. en vista de que al azar, las probabilidades de tomar sueros con títulos de 1:100 a 1:200 eran pocas, por

ser muy reducido el número de ellos; además el objetivo principal de nuestro trabajo es valorizar las técnicas serológicas, no determinar incidencia de brucelosis, por lo que nos inclinamos a hacer una selección parcial de los sueros con mayor volumen, considerando que nos serían más útiles para la realización de nuestras pruebas. A los 225 sueros seleccionados se les practicó el estudio comparativo objeto de nuestro trabajo. Posteriormente, fueron sometidos a calentamiento en baño maría, a una temperatura de 56 grados C., durante 15 minutos, y se realizaron nuevamente las tres pruebas citadas anteriormente.

Las lecturas de las pruebas fueron realizadas de acuerdo a la técnica correspondiente. Así, para la prueba de placa se daba un tiempo máximo de 8 minutos para efectuar la lectura (11). En la de tubo se hacía la lectura a las 24 y 48 horas de incubación en la estufa, a 37 grados C., tomando como definitiva la última (4, 18). En la de fijación en superficie, se esperaba que la solución salina subiera totalmente hasta el borde superior del papel, que tomaba un tiempo aproximado de 20 a 30 minutos.

Los antígenos empleados en la ejecución de estas pruebas fueron: antígeno coloreado de *Brucella abortus*, cepa 1119-3, del United States Department of Agriculture, AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE, Washington, D. C. Para la prueba de tubo, antígeno sin colorear, obtenido del Centro de Investigaciones Médicas del Hospital General de México, D. F. (4), y para la prueba de fijación en superficie, papel monovalente (2), obtenido del Centro de Investigaciones Médicas del Hospital General de México, D. F.

Por ser menos conocida en el campo médico veterinario la prueba de fijación en superficie, describiremos el principio en el que se fundamenta y su técnica de ejecución tomado esto de su propio autor (2, 3, 4).

La prueba de "fijación en superficie" se ejecuta en forma semejante a procedimientos cromatográficos y en la que el antígeno va impreso en pequeños círculos sobre hojas de papel filtro. Cuando el suero se coloca sobre el antígeno y se hace ascender por capilaridad una corriente de solución salina isotónica, se revela el resultado de la reacción.

El principio del método consiste en que la mezcla de suero normal y antígeno no tiene afinidad para el papel filtro en que se coloca; pero si el antígeno sufre la acción del anticuerpo, cambia sus propiedades y se adhiere al papel, por lo que no puede ser retirado por lavado.

PRACTICA DE LA PRUEBA.—Para una reacción individual, se corta en sentido transversal una fracción del papel destinado para la prueba, en el cual figuren tres manchas. Sobre la mancha central se deposita una gota del suero desconocido por medio de un asa de 3 m.m. de diámetro. En las manchas laterales se colocan gotas de sueros control positivo y negativo. Cuando haya necesidad de estudiar varios sueros, se dispone de hojas de papel más grandes con varias manchas y conviene reservar el primero y último lugar para los controles negativos y otra mancha para el positivo. En esta forma se obtienen dos puntos de referencia considerando el extremo superior de cada una de las huellas dejadas por el suero control negativo que, unidos

por una línea trazada a lápiz, darán mejor contraste para graduar las reacciones de los sueros problemas.

Se suspende el papel sobre un recipiente conteniendo solución salina isotónica, teniendo cuidado de que al sumergir el borde cercano a las manchas éstas queden a 1 cm. sobre la superficie del líquido. Por capilaridad el líquido asciende, llegando en un término de 20 a 30 minutos al borde superior del papel. Al pasar por las manchas del control negativo, arrastra la tinta dejando una huella que puede llegar hasta el borde superior. En el control positivo la mancha permanece fija. La reacción del suero desconocido se interpreta por comparación con los controles, graduándose su intensidad de 0 a + + + + o bien de 0 a 100%.

RESULTADOS

Los resultados de los 2500 sueros de cerdos trabajados con la prueba de placa los resumimos en la tabla I.

Para apreciar la variación de los títulos de las reacciones, tomamos como prueba base para la comparación de las técnicas, la de placa, tanto para sueros sin calentar como para los calentados, ya que fue el primer método que se les aplicó a los sueros en la realización del trabajo. Estos resultados los podemos observar en las tablas II, III, IV y V.

Tabla 1.—Incidencia de Aglutininas en 2500 Cerdos Sacrificados en el Rastro del D. F., Determinada por la Prueba de Placa (Reacción de Huddleson).

Títulos	Núm. de		Reactores			
	Casos	Porcentajes	Negativos (0)		Positivos (+)	
			Casos	%	Casos	%
0	2123	84.92	2123	84.92	—	—
25	71	2.84	—	—	71	2.84
50	221	8.84	—	—	221	8.84
100	76	3.04	—	—	76	3.04
200	9	0.36	—	—	9	0.36
400	—	—	—	—	—	—
	2500	100.00%	2123	84.92	377	15.08

67
 TABLA 2.—Pruebas de Aglutinación en Placa y en Tubo Empleadas en 225 Sueros Sin Calentar, de Cerdos Sacrificados en el Rastro del D. F.

Aglutinación en Placa			AGLUTINACION EN TUBO									
			0		25		50		100		200	
Títulos	Casos	%	Casos	%	Casos	%	Casos	%	Casos	%	Casos	%
0	93	41.33	77	34.22	16	7.11	—	—	—	—	—	—
25	59	26.22	—	—	55	24.45	4	1.78	—	—	—	—
50	62	27.55	—	—	12	5.33	49	21.77	—	—	1	0.445
100	10	4.45	—	—	7	3.11	—	—	3	1.34	—	—
200	1	0.45	—	—	—	—	—	—	—	—	1	0.445
Total	225	100.00	77	34.22	90	40.00	53	23.55	3	1.34	2	0.890

— 89 —

Tabla 3.—Pruebas de Aglutinación en Placa y Fijación en Superficie Empleadas en 225 Sueros Sin Calentar, de Cerdos Sacrificados en el Rastro del D. F.

Aglutinación en Placa			FIJACION EN SUPERFICIE									
			0		+		++		+++		++++	
Títulos	Casos	%	Casos	%	Casos	%	Casos	%	Casos	%	Casos	%
0	93	41.43	90	40.00	2	0.89	—	—	1	0.44	—	—
25	59	26.22	58	25.77	1	0.44	—	—	—	—	—	—
50	62	27.55	53	23.55	9	4.00	—	—	—	—	—	—
100	10	4.45	—	—	2	0.89	5	2.22	3	1.34	—	—
200	1	0.45	—	—	—	—	—	—	1	0.44	—	—
Total	225	100.00	201	89.34	14	6.22	5	2.22	5	2.22	—	—

Equivalencia de %s de Fijación en Superficie:

- 0 — 15 = 0 (Negativo)
- 20 — 25 = + (Positivo)
- 30 — 55 = ++ (Positivo)
- 60 — 75 = +++ (Positivo)
- 80 — 100 = ++++ (Positivo)

69

66

TABLA 4.—Pruebas de Aglutinación en Placa y en Tubo Empleadas en 225 Sueros Calentados, de Cerdos Sacrificados en el Rastro del D. F.

Aglutinación en Placa			AGLUTINACION EN TUBO									
			0		25		50		100		200	
Titulos	Casos	%	Casos	%	Casos	%	Casos	%	Casos	%	Casos	%
0	118	52.45	115	51.12	3	1.33	—	—	—	—	—	—
25	52	23.11	11	4.88	41	18.22	—	—	—	—	—	—
50	48	21.33	4	1.78	25	11.11	19	8.45	—	—	—	—
100	7	3.11	—	—	—	—	—	—	4	1.78	3	1.33
200	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Total	225	100.00	130	57.78	69	30.66	19	8.45	4	1.78	3	1.33

70
 TABLA 5.—Pruebas de Aglutinación en Placa y Fijación en Superficie Empleadas en 225 Sueros Calentados, de Cerdos Sacrificados en el Rastro del D. F.

en Placa Aglutinación			FIJACION EN SUPERFICIE									
			0		+		++		+++		++++	
Títulos	Casos	%	Casos	%	Casos	%	Casos	%	Casos	%	Casos	%
0	118	52.45	112	49.77	2	0.89	4	1.78	—	—	—	—
25	52	23.11	48	21.34	3	1.33	—	—	1	0.45	—	—
50	48	21.33	37	16.44	7	3.11	2	0.89	2	0.89	—	—
100	7	3.11	—	—	1	0.45	—	—	6	2.66	—	—
200	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Total	225	100.00	197	87.55	13	5.78	6	2.67	9	4.00	—	—

Equivalencia de %s de Fijación en Superficie:

- 0 — 15 = 0 (Negativo)
- 20 — 25 = + (Positivo)
- 30 — 55 = ++ (Positivo)
- 60 — 75 = +++ (Positivo)
- 80 — 100 = ++++ (Positivo)

DISCUSION

Podemos observar en las tablas II y IV que existe bastante concordancia de los títulos de aglutinación en placa con los de aglutinación en tubo; la ligera discrepancia existente, la podemos atribuir a la diferencia de antígenos empleados, pues no siempre se preparan antígenos con las debidas precauciones para evitar falsas reacciones, siendo frecuente que éstas resulten exageradas por excesiva sensibilidad del antígeno, o negativas (0), o de títulos muy bajos cuando en su preparación se emplean cepas de *Brucella* muy alteradas. También es notorio que los sueros calentados bajaron su título en general, aumentando así el número de reacciones negativas (0); esto nos sugiere que el calentamiento posiblemente destruyó anticuerpos inespecíficos que aumentan los títulos en cierto grado (18).

Los títulos de aglutinación en placa muestran un estrecho paralelismo con los porcentajes de fijación en superficie; podemos apreciar en las tablas III y V que existe una concordancia muy marcada entre los sueros negativos (0) a la aglutinación y los negativos a la fijación en superficie. También podemos observar que de los sueros con títulos de aglutinación de 1:25 a 1:50 fueron muy pocos los que reaccionaron positivamente a la fijación en superficie, y los que lo hicieron fue con reacciones débiles; en cambio, títulos de 1:100 a 1:200 dieron fijaciones en superficie positivas intensas.

De los sueros negativos a la aglutinación en placa, 6 de los calentados y 3 de los no calentados reaccionaron positivamente a la fijación en superficie; esto posiblemente se deba a la interferencia de anticuerpos incompletos que, a pesar de unirse al antígeno, carecen de actividad para aglutinarlo, o por acción de bloqueo, se unen al antígeno impidiendo la reacción con anticuerpos completos (4), fenómenos que no influyen en la fijación en superficie.

Acumulando el porcentaje de reacciones positivas determinada por cada una de las pruebas, podemos apreciar que, la prueba de fijación en superficie fue la que reveló mayor porcentaje: 10.66% en contraste con 4.90% y 2.23% con las pruebas de placa y de tubo respectivamente, en los sueros sin calentar y, 12.45% en relación a 3.11%, cantidad esta última obtenida con las pruebas de aglutinación en sueros calentados. La discrepancia en los resultados puede dar lugar a dos interpretaciones:

1) Que la prueba de fijación en superficie es demasiado sensible y por tanto exagera los resultados positivos, o bien, 2) que permita encontrar mayor porcentaje de animales infectados ya que, como se dijo antes, revela con mayor intensidad reacciones antígeno-anticuerpo con sueros que por circunstancias especiales no manifiestan esa reacción por los métodos de aglutinación (5).

Basándose en nuestros resultados, en los obtenidos en el hombre por Castañeda (3) verificados estos últimos por el hemocultivo comprobando la marcada especificidad de la prueba, y otros trabajos realizados en bóvidos por este mismo investigador y colaboradores (3, 5), además de las investigaciones realizadas por Caldas y Machaño (6, 7) en cerdos, nos inclinamos a considerar la prueba de fijación en super-

ficie como un método de diagnóstico que aporta buen número de ventajas para su aplicación en la rutina serológica de diagnóstico de la brucelosis en cerdos, ya que es una prueba muy práctica, de ejecución rápida y fácil y con especificidad aceptable.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos, podemos postular las siguientes conclusiones:

- 1.—La incidencia de aglutininas en 2500 cerdos sacrificados en el rastro del D. F., determinada por la prueba de placa fue de 15.08%.
- 2.—Los sueros calentados bajaron sus títulos de aglutinación.
- 3.—Se obtuvo una concordancia casi de 100% entre los sueros que no reaccionaron a las pruebas de aglutinación y los negativos a la fijación en superficie.
- 4.—Sueros con títulos de aglutinación inferiores a 1:100, excepcionalmente reaccionaron con fijaciones en superficie francas.
- 5.—Sueros con títulos de aglutinación superiores a 1:100, en general reaccionaron con fijaciones en superficie positivas intensas.
- 6.—Las pruebas de aglutinación en placa y en tubo revelaron igual porcentaje de reacciones positivas en los sueros calentados.
- 7.—La prueba de fijación en superficie dio un porcentaje mayor de reacciones positivas que las pruebas de aglutinación en placa y en tubo.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—BERTHELON, M. ET LAFENETRE. Le diagnostic de la brucellose chez les animaux domestiques. Of. Int. de Epiz. Tomo L. p: 138. (1958).
- 2.—CASTAÑEDA, M. RUIZ. Surface fixation. A new method of detecting certain immunologic reactions. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 73:46. (1950).
- 3.—CASTAÑEDA, M. RUIZ. Surface fixation. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 83:36. (1953).
- 4.—CASTAÑEDA, M. RUIZ. Brucelosis. La Prensa Médica Mexicana. pp: 57-60-73-75. (1954).
- 5.—CASTAÑEDA, M. RUIZ, FLORES BELTRAN A. y MALAGA ALBA A. Investigación de la brucelosis bovina por la prueba de fijación en superficie. OMS. Comité de expertos en Brucelosis de FAO/OMS. Lima, Perú, 9-14 oct. 1957. No. agenda 3.2.3.
- 6.—CALDAS, A. D., L. POUZA MACHADO e N. PLANET. O teste de fixacao em superficie de Castañeda para o diagnóstico da Brucelose. Observacoes sobre sua execucao e leitura. Do Inst. Biol. de Sau Paulo. 22:87-92. (1955).
- 7.—CALDAS, A. D. e MACHADO L. J. P. Emprego da prova da fixacao em superficie de Castañeda o diagnóstico da brucelose suina. Do Inst. Biol. de Sau Paulo 22:243-247. (1955).
- 8.—CAMERON, H. S. Brucellosis in swine. The interpretation of low titer reactions in experimental and field infections. Amer. Jour. Vet. Res. 4:169. (1943).
- 9.—CAMERON, H. S., and CARLSON, P. A. Brucellosis in swine. III. Studies on the diagnostic titer in the individual. Amer. Jour. Vet. Res. 5:333. (1944).
- 10.—DUNNE, W. HOWARD. Diseases of swine. The Iowa State University Press, Ames, Iowa, U. S. A. p:276. Primera reimpresión. (1959).
- 11.—HAGAN, A. W. y BRUNER W. D. Enfermedades Infecciosas de los animales domés-

- ticos. La Prensa Médica Mexicana. p:256. Traducción de la 3a. edición en inglés. (1961).
- 12.—HUTYRA, V. FRANZ, MAREK JOSEF y MANNINGER RUDOLF. Pantología y Terapéutica especiales de los animales domésticos. Editorial Labor, S. A., tomo I. p:617. Segunda reimpresión. (1953).
 - 13.—KERKAMP, H. C. H. and ROEPKE, M. H. The interpretation of low agglutination titers in the control of swine brucellosis. Amer. Jour. Vet. Res. 9:46. (1948b).
 - 14.—LEVINE, N. D. and GRAHAM, R. The incidence of swine brucellosis in Illinois. Jour. Amer. Vet. Med. Assn. 116:443 (1950).
 - 15.—MERCHANT, I. A. y PACKER, R. A. Bacteriología y Virología Veterinarias. Ed. Reverte, S. A. Ed. Acribia. p:474 1ª edición en español (1958).
 - 16.—OTTOSEN, H. E. Diagnostic des brucelloses animales. Tomo L. p:97. (1958).
 - 17.—STABLEFORTH and GALLOWAY. Diseases due to bacteria. Butterworths Scientific Publications, London. Vol. I. p:68-69. (1959).
 - 18.—STURA, CARLOS ALBERTO. Tratado de Inmunobiología y Serología. Ed. Alfa. Buenos Aires. Tomo II. p:110-111 y tomo III. p:116. (1952).
 - 19.—UGARTE, JOSE MANUEL. Bases estadísticas de la Investigación Médica. p:61-63. Universidad de Chile. Santiago. (1958).