



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN - FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
PROGRAMA PROCIENCIA - PROYECTO PINV15-377

“Genotipificación de cepas de *Brucella spp.* en cultivos aislados de rumiantes en el Paraguay.”

Métodos de Diagnóstico de Brucelosis

Prof. Dr. Guillermo Giménez Baraeiro, MSc.

Setiembre - 2020

Componente I – FOMENTO A LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA – Fondos Concursables de Proyectos I+D

Objetivo del componente: Promover actividades orientadas a estimular la inversión en generación de conocimientos y a fortalecer la transferencia de los resultados al sector privado y público de Paraguay.



Con el apoyo de:



“Genotipificación de cepas de Brucella spp. en cultivos aislados de rumiantes en el Paraguay”
Programa PROCIENCIA – Convocatoria 2015 – Proyecto PINV15-377



Definición

La brucelosis es una enfermedad infecciosa y contagiosa de distribución mundial, producida por bacterias del género *Brucella*, que ataca a varias especies de mamíferos, dentro de los cuales se encuentra el ser humano, en el cual produce un cuadro febril inespecífico.



Sinonimia

Fiebre de Malta

Fiebre Ondulante

Aborto Contagioso

Enfermedad de Bang

En guaraní: Memby Kua



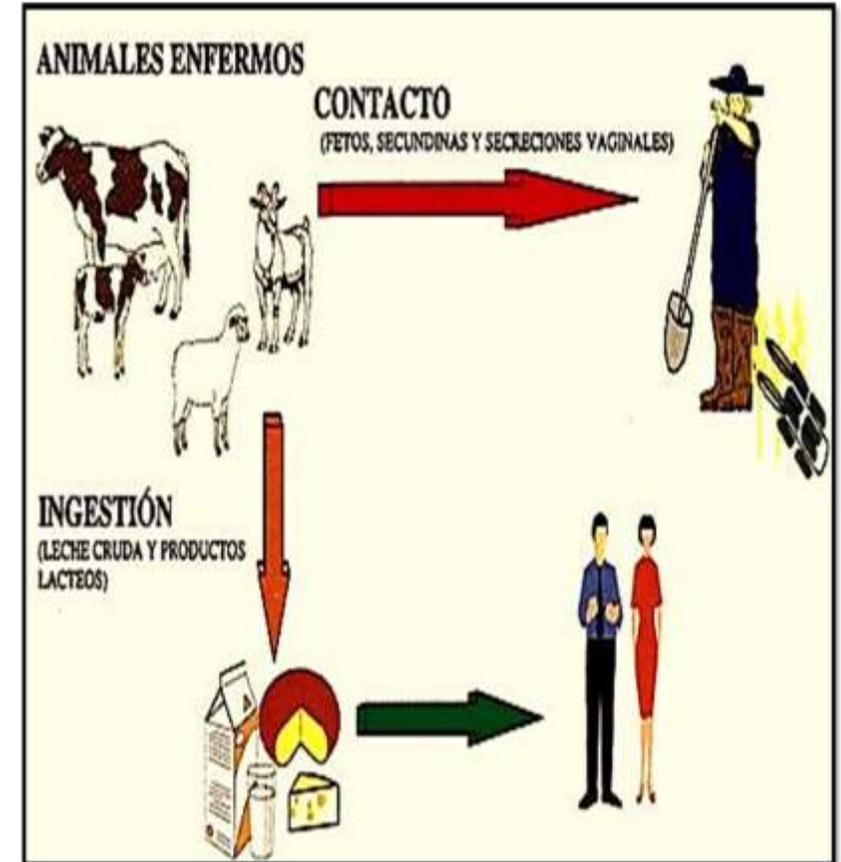
Introducción

Es una zoonosis debido a que los animales pueden transmitir la enfermedad al hombre.

La enfermedad en humanos se da por el consumo de alimentos de origen animal (leche sin pasteurizar, queso proveniente de leche contaminada, por exposición ocupacional (veterinarios y laboratoristas, etc.)

En bovinos, porcinos, ovinos y caprinos son causa de aborto debido a que las placentas y membranas fetales de estos animales contienen eritritol, excelente factor de crecimiento para estas bacterias, situación que no ocurre en el ser humano debido a la carencia de éste.

También produce placentitis, epididimitis y orquitis.



Etiología

- Familia Brucellaceae.
- Cocobacilo Gram –
- Inmóviles sin capsula y no formadores de esporas
- Oxidasa y catalasa positiva
- Parásitos intracelulares obligados del sistema fagocítico mononuclear
- Aerobias
- Crecimiento lento en cultivo.
- Algunas requieren una suplementación con CO₂ para su aislamiento primario en el laboratorio



Etiología

- Pueden ser inactivadas mediante radiación gamma (por ej. en el calostro) y la pasteurización.
- Su persistencia en el queso no pasteurizado está influenciada por el tipo de fermentación y el tiempo de maduración.
- Se desconoce cuál es el tiempo de fermentación necesario para garantizar la seguridad en quesos maduros y fermentados, se calcula que es de aproximadamente 3 meses.
- Se ha informado que la Brucella permanece en el helado durante semanas y en la manteca durante meses.
- Este organismo sobrevive durante períodos de tiempo muy cortos en la carne, a menos que esté congelada donde puede sobrevivir por años

Ciclo de Transmisión



Especies	Huésped natural	Infecta al hombre
<i>mellitensis</i>	Cabra, oveja	si
<i>abortus</i>	vaca	si
<i>suis</i>	Cerdo, roedores	si
<i>canis</i>	perro	si
<i>ovis</i>	oveja	no
<i>neotomae</i>	roedores	no

ESPECIE

HUESPED

abortus



Bovinos



suis



Porcinos



melitensis



Ovinos



Caprinos

canis



Canino

ovis



Ovino

neotomae



Neotomae lepida (roedor)

maris



Mamíferos marinos



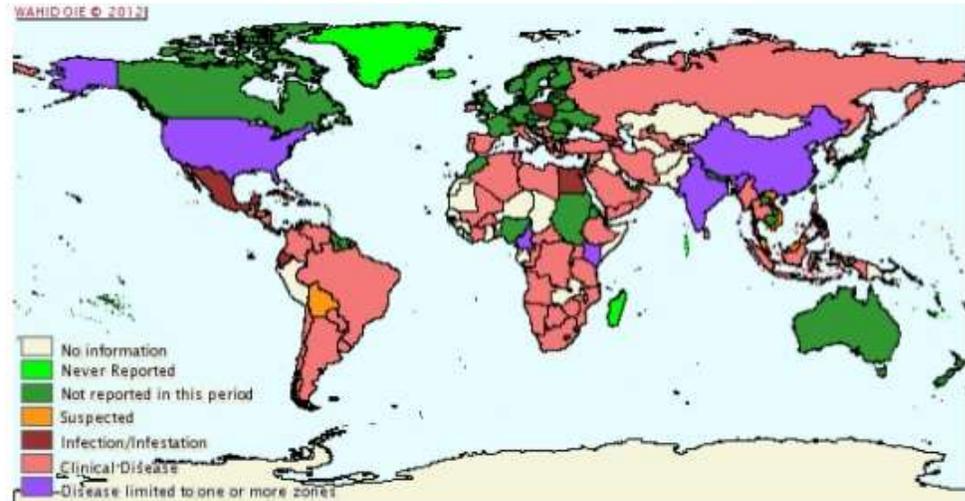
Tiempo de supervivencia de la Brucella.

<i>Material</i>	<i>Tiempo de supervivencia</i>
Suelo y estiércol	80 días
Polvo	15-40 días
Leche a temperatura ambiente	2-4 días
Flúidos y secreciones en verano	10-30 minutos
Lanas de depósitos	110 días
Agua a 37 °C y pH 7,5	menos de 1 día
Agua a 8 °C y pH 6,5	más de 57 días
Fetos mantenidos a la sombra	6-8 meses
Descarga vaginal mantenida en hielo	7 meses
Manteca a 8 °C	1-2 meses
Cuero manchado con excremento de vaca	21 días
Paja	29 días
Grasa de ordeño	9 días
Heces bovinas naturales	1-100 días
Tierra húmeda a temperatura ambiente	66 días
Tierra desecada a temperatura ambiente	4 días.

Distribución geográfica.

- Los mayores niveles de incidencia se sitúan en Oriente Medio, la región Mediterránea, el África subsahariana, China, India, México y América del Sur.
- Actualmente, el crecimiento más agudo en número de casos se está registrando en países de Asia Central y Sudoriental.
- Se cree que varios países de Europa Occidental y del Norte, así como Canadá, Japón, Australia y Nueva Zelanda, están libres del agente infeccioso.

Epidemiología



Libre de *Brucella abortus* y *B. melitensis*: Austria, Australia, Canadá, Checoslovaquia, Alemania, Japón, Nueva Zelanda, Suecia, Polonia, Rumania.

Regiones con mayor incidencia: Cuenca del Mediterráneo, Asia y América Latina.

Fuente: OIE, 2012

Huéspedes Susceptibles.

- La brucelosis afecta a los bovinos, porcinos, ovinos, caprinos, equinos, camélidos y caninos.
- También puede infectar a otros rumiantes, algunos mamíferos marinos y al ser humano.
- Las brucelosis del ganado bovino (*B. abortus*), ovino y caprino (*B. melitensis*) y de los porcinos (*B. suis*) son enfermedades que figuran en el Código Sanitario para los Animales Terrestres de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y deben ser notificadas de manera obligatoria a la OIE (Código Sanitario para los Animales Terrestres)



B. abortus

- Bacteria is excreted in genital secretions (including semen), milk, colostrum.
- **Survival time:**
 - Cheese at 4°C: 180 days !!!
 - Water at 25°C: 50 days
 - Meat and salted meat: 65 days
 - Manure at 12°C: 250 days !!!!
- **Widespread:** Cattle, Bison, Elk, Deer, Moose, Horse, Sheep, Goat, Swine, Donkey, Dogs, Birds, Hares, Fox, Rats, mice, Camels and Human.



B. abortus



- **Sources of Human Infection:**
 - Raw milk and products /Direct contact
- **Portal of entry:** oral mucosa, nasopharynx and conjunctivae, genital then X in regional lymph node and spread to RES (nodes of udder, uterus, erythritol...). Placentitis with endometritis. Fetus die with edema /congestion of lung, disseminated hemorrhages of epicardium and splenic capsule. Bacteria in lung and digestive tract of the fetus.

B. melitensis

- Goat (1886), Sheep, Cow (1905 in Malta), Swine, Hares, Camels, Buffalo, Impala.



B. suis

- Wild pigs, Rats, Swine.
- Abortion, metritis, bursitis, spondylitis (Lumbar and sacral), arthritis, orchitis, paralysis.



Brucella canis

- *Brucella canis* was first described as a cause of abortion in beagles in the USA
- It was subsequently shown to infect dogs in many other countries, irrespective of breed
- An occasional cause of brucellosis in humans

Brucelosis en el ganado Bovino

Etiología: Es causada casi exclusivamente por *Brucella abortus*; sin embargo *B. suis* o *B. mellitensis* están implicadas algunas veces. Las especies de *Brucella* son microorganismos facultativos, intracelulares, capaces de sobrevivir y multiplicarse dentro de las células de la defensa.



Brucella melitensis

- Huéspedes principales: cabras y ovejas
- Más patogénico en humanos y la más frecuente
- Los casos en humanos se da por ingestión de productos lácteos sin pasteurizar



Brucella abortus

- Huéspedes principales: ganado vacuno
- Los casos en humanos se da por ingestión de productos lácteos sin pasteurizar

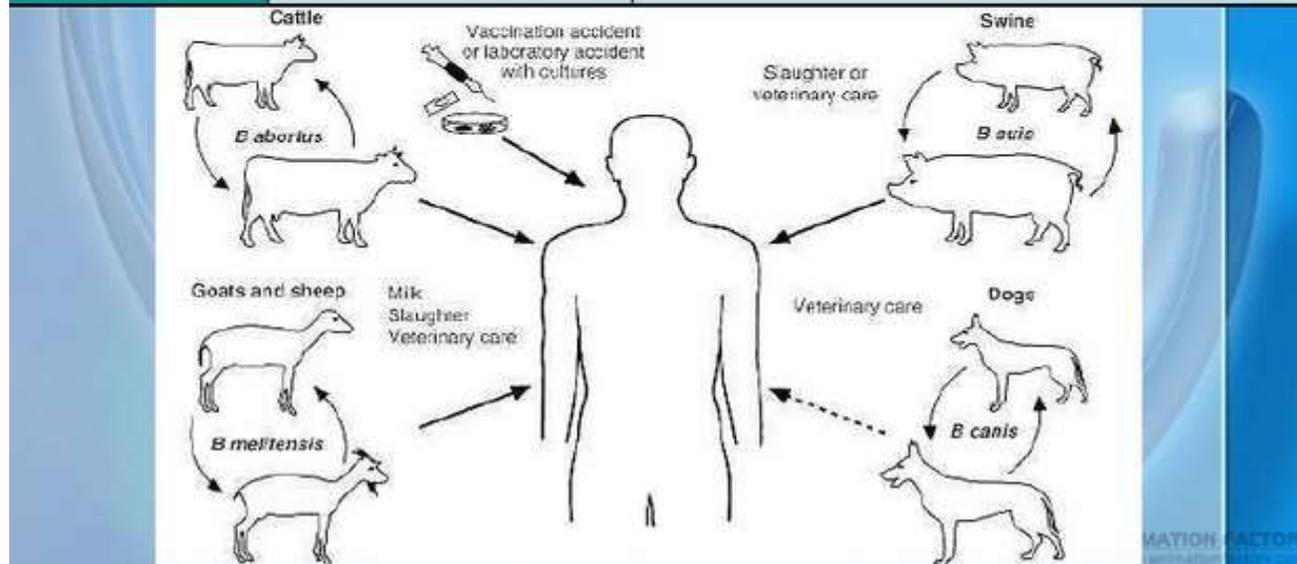


Patogenicidad

- La virulencia de las brucelas está en función de la presencia de lipopolisacáridos (LPS) en su superficie.
- Las cepas lisas son más virulentas que las rugosas debido a su abundante cantidad de LPS.
- Período de incubación es de 5 días, 4 semanas a 3 meses, promedio 2 semanas.

Formas de adquisición en el hombre

Vías de entrada	Formas de adquisición	
Abrasiones en la piel	Ocupacional	Atención a animales, medicina veterinaria, tablajeros, inspectores de carne y laboratorios de investigación
Digestiva	Ingestión de alimentos contaminados	Leche o derivados sin pasteurizar (queso fresco de leche de cabra), carne o derivados sin cocción
Respiratoria	Inhalación de brucelas	Atención de abortos en animales, laboratorio de microbiología
Persona a persona	Transmisión sexual	Semen infectado
Autoinoculación accidental	Ganaderos, veterinarios	Pinchazo con aguja, salpicadura en conjuntiva ocular



Síntomas en el bovino (B. abortus)



- Causa abortos, mortinatos y terneros débiles; los abortos generalmente ocurren durante la segunda mitad del período de gestación. Es posible que la placenta quede retenida y disminuya la lactancia
- Después del primer aborto, las preñeces subsiguientes son generalmente normales; sin embargo, las vacas pueden eliminar el organismo en la leche y en las descargas uterinas.
- En los toros: epididimitis, vesiculitis seminal, orquitis y abscesos testiculares.
- En ocasiones se produce infertilidad en ambos sexos, debido a metritis u orquitis/epididimitis
- Puede haber higroma y artritis en las articulaciones

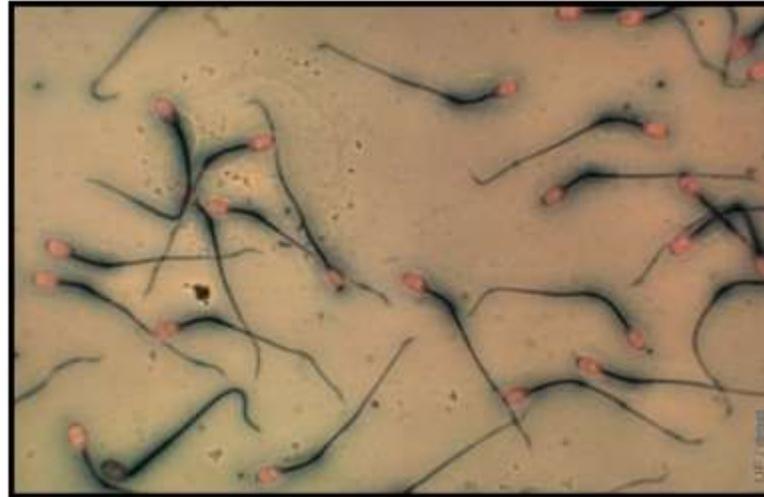
Síntomas en ovinos y caprinos (*B. melitensis*)

- Abortos, mortinatos y nacimientos de crías débiles
- Las ovejas y las cabras generalmente abortan una sola vez, aunque la reinvasión del útero y la eliminación de brucelas pueden ocurrir durante las preñeces subsiguientes.
- Reducción de la producción de leche en los animales que abortan.
- No son comunes los signos de mastitis.
- Orquitis y epididimitis graves en los machos y esto puede producir infertilidad.
- En ocasiones, se observa artritis en ambos sexos



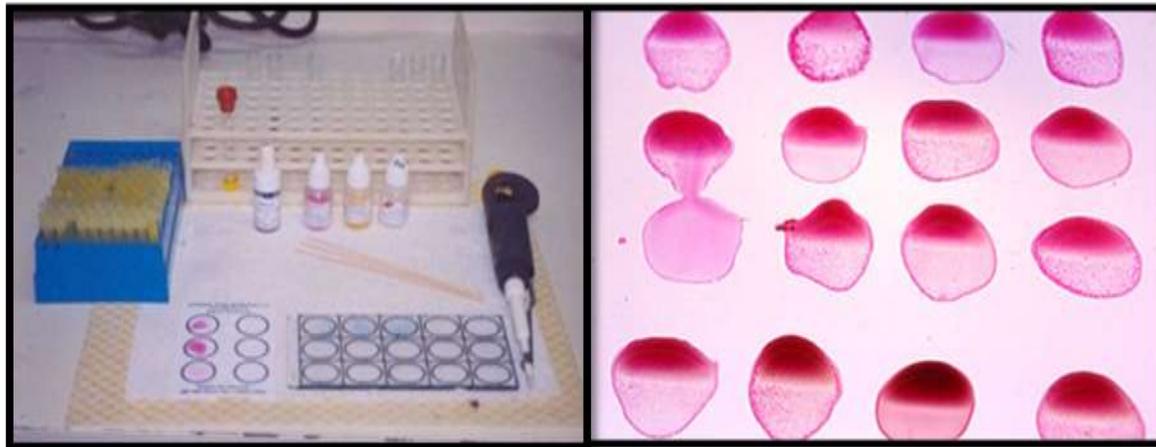
B. Ovina

- B. ovis afecta a las ovejas pero no a las cabras. Este organismo causa epididimitis, orquitis y fertilidad reducida en los carneros.
- Atrofia de los testículos.
- En las hembras se pueden observar abortos, placentitis y mortalidad perinatal, aunque esto no es común



Diagnóstico

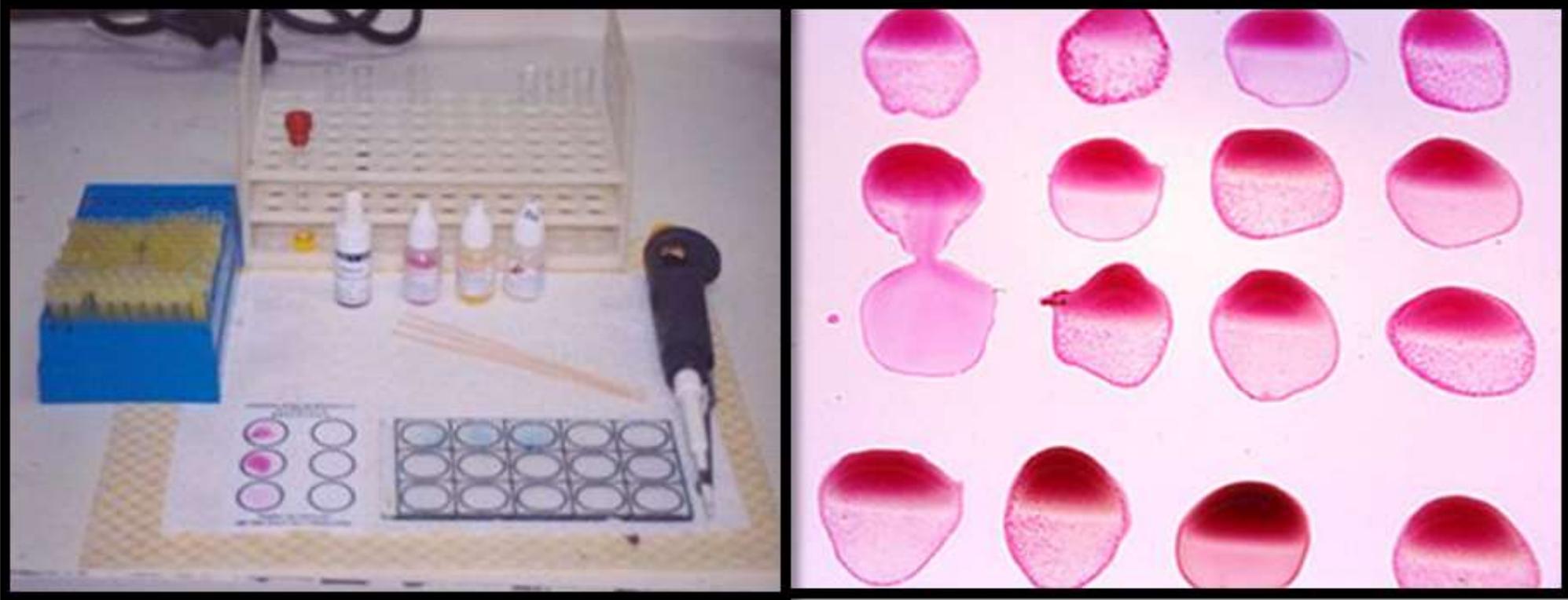
- Clínico
- Síntomas
- Métodos directos
- Métodos indirectos



Toma de muestra



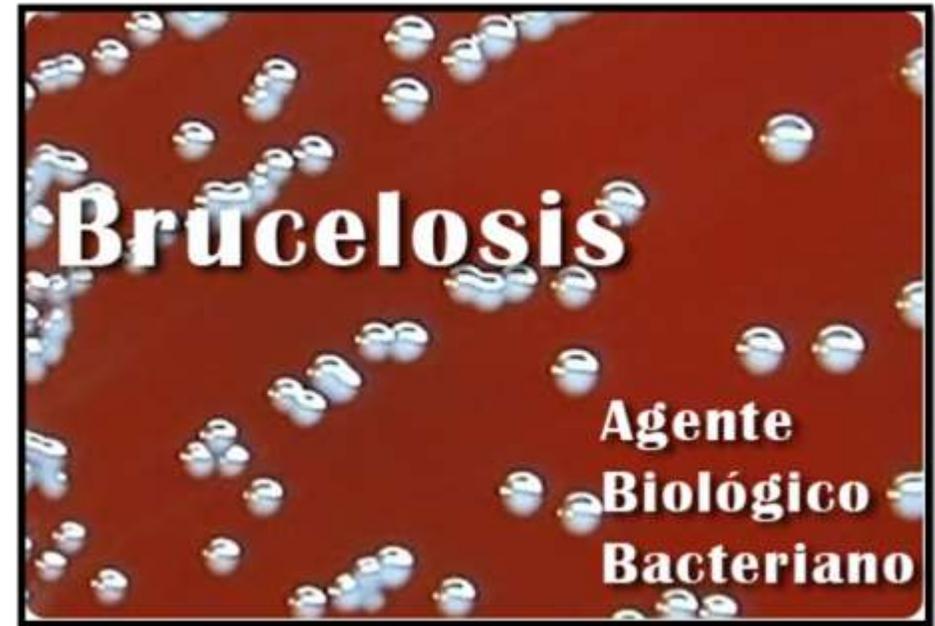
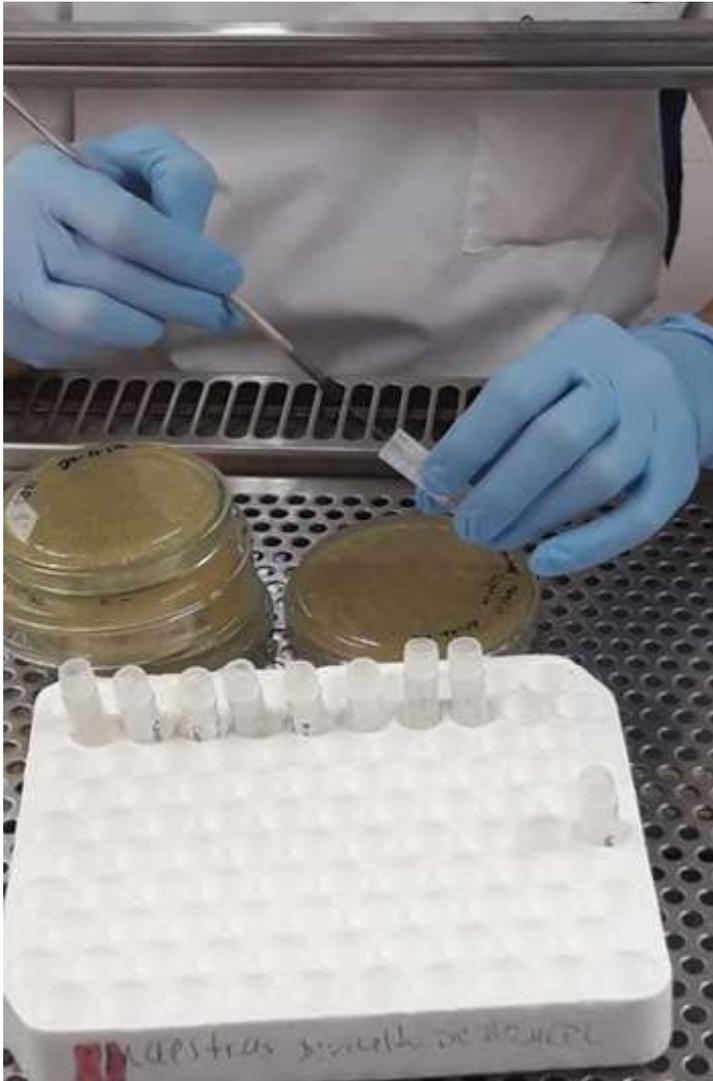
Serología.







Cultivo.



Diagnóstico

Métodos directos

- **Hemocultivo en caldo triptasa y agar triptasa o Bactec**
 - Crecimiento lento
 - Muestras de ganglios, bazo...
- **ELISA**
- **Inmunofluorescencia directa**
- **Hemaglutinación reversa**
- **Reacción en cadena de la polimerasa**

Diagnóstico

Métodos indirectos

A) Aglutinación lenta en tubo de Wright (SAT)

- Título significativo: no existe consenso

B) Prueba de aglutinación con y sin 2-mercaptuetanol (2-ME)

- Título significativo: mayor de 1:20.

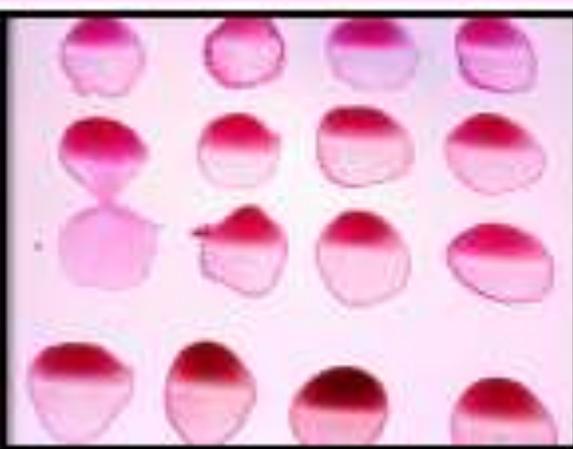
C) Reacción de Huddleson

- Título significativo: mayor de 1:40. Tener en cuenta fenómeno de prozona

D) Prueba de Rosa de Bengala

- (+) o (-)

Pruebas de screening

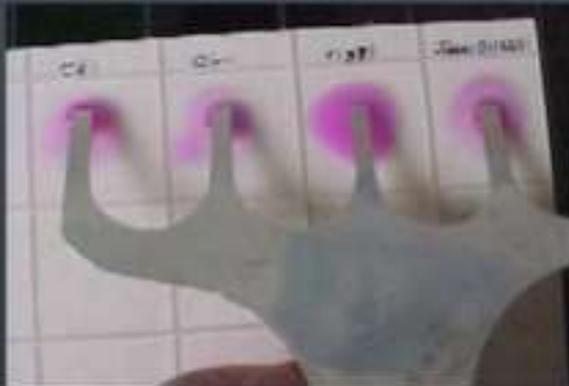


ROSA DE BENGALA

Antígeno: células completas e inactivadas de *Brucella abortus*

Anticuerpos anti *Brucella abortus* presentes en suero

Tinción con el colorante Rosa de Bengala a pH 3 para favorecer la actividad de la IgG1



Homogenización
e incubación
(Antígeno + suero)

=

Positiva:
FORMACION DE
UNA RED DE
AGLUTINACION



Negativa: No Formación de la red de aglutinación.

Diagnóstico

Métodos indirectos

E) Antígeno Tamponado en Placa (BPA):

- (+) o (-)

F) Prueba de Coombs

G) Fijación de complemento:

Prueba de referencia internacional.

- *Título significativo: mayor de 1:20 .*

Diagnóstico

Métodos indirectos

H) Inmunofluorescencia indirecta

- *Título significativo: mayor de 1:80*

I) ELISA: muy sensible, específica y versátil

- *ELISA indirecto (ELISA-I):*
- *ELISA competitivo (ELISA-C):*
- *Anticuerpos: aglutinantes y no aglutinantes.*
- *(+) = % de inhibición >28%*

J) Polarización de fluorescencia (FPA)

K) Prueba de inmunodifusión en agar (IDAG)

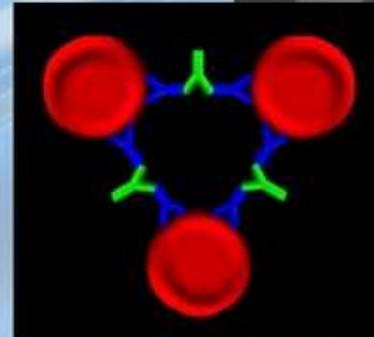
Diagnóstico

- Aglutinación en placa:
 - Rosa de Bengala → prueba cualitativa (screening), IgM e IgG
 - Huddleson → → prueba cuantitativa; IgM, IgG e IgA; (>1:40)
- Aglutinación en tubo (STA) → IgM e IgG (con y sin 2ME). (> 1:20)
- EIA → Igual S pero > E ; detecta IgM, IgG e IgA
- Fijación de complemento → alta/ E, es el método de referencia internacional (> 1:20)
- IFI (>1:80)

Diagnóstico

Métodos sugeridos

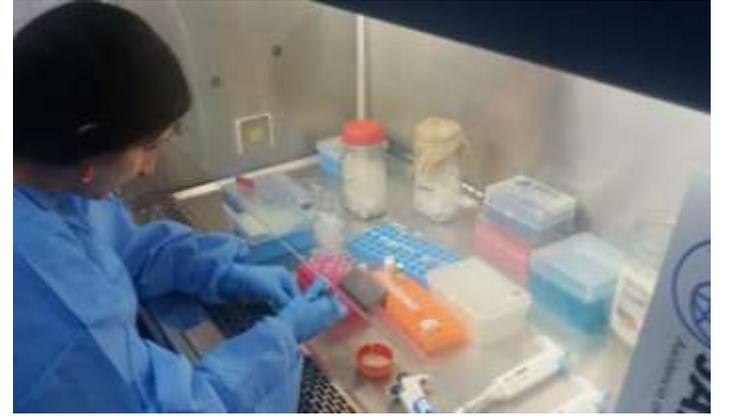
- Tamiz
 - Rosa de Bengala
 - Huddleson
- Confirmatorias
 - Aglutinación lenta de Wright en tubo con y sin 2-ME
 - Coombs
 - Fijación de complemento

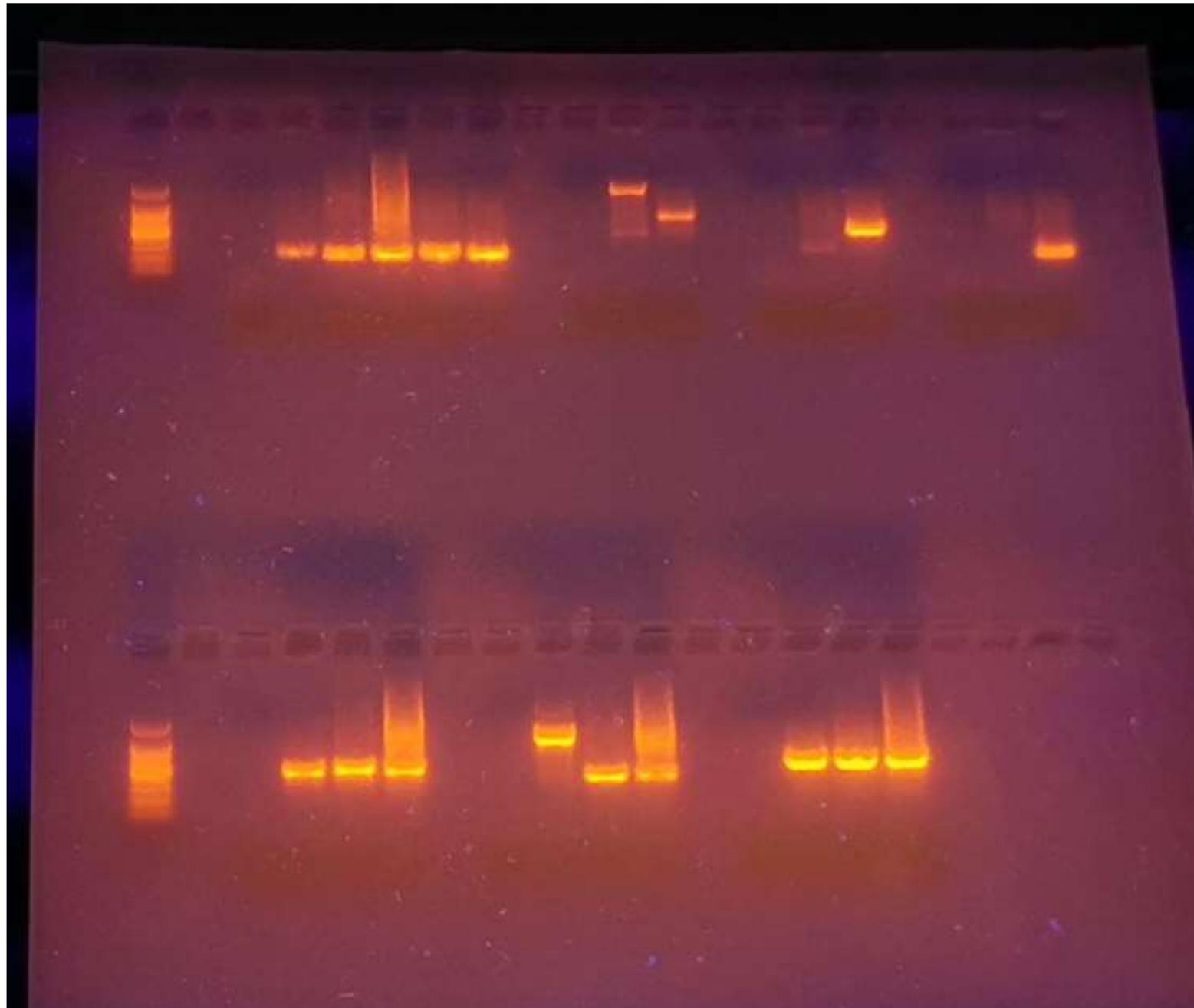


PCR.(Reacción de la cadena de la polimerasa).

Detección de secuencias específicas de ADN.

	Identificación	Nombre del primers	Secuencia (5'-3')
1	Género <i>Brucella</i> spp.	B4	TGGCTCGGTTGCCAATATCAA
		B5	CGCGCTTGCCCTTCAGGTCTG
2	<i>B. abortus</i> spp.	Ab1F	GCTACGGGCAACTTCAACTG
		Ab1R	CACCCAGAACCGAGACACTAC
3	<i>B. melitensis</i> spp.	Me2F	TCGCAATGAAAGACCAGAAA
		Me2R	TTATTCTGCCGCTTCAAGG
4	<i>B. melitensis</i> bv. 1	Me1F	GGTTCAGATGTTGAAGGGTCA
		Me1R	CCTGATGGATACGCTCAAAGA
5	<i>B. ovis</i>	Ov1F	CACCATCAACACCGTCATGT
		Ov1R	GCAGATCAGTCGGCCAGTAT
6	<i>B. abortus</i> S19	ERI 1	TTGGCGGCAAGTCCGTCGGT
		ERI 2	CCCAGAAGCGAGACGAAACG
7	<i>B. abortus</i> RB51	Primer 1	TTAAGCGCTGATGCCATTTCTTCAC
		Primer 2	TTTAGTTTGCCGTAATATAGGTCTAGAACCTGTC
		Primer 3	GCCAACCAACCCAAATGCTCACAA





Diagnóstico diferencial

- Leptospirosis
- Rinotraqueitis infecciosa bovina
- Tricomoniasis
- Campilobacteriosis
- Listeriosis
- Espiroquetosis (aborto epizoótico)



Muchas Gracias