
Universidad de Guadalajara

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



ESTUDIO COMPARATIVO DE CINCO TECNICAS SEROLOGICAS
PARA EL DIAGNOSTICO DE LA BRUCELOSIS CAPRINA

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

JORGE TORRES AGUILAR

GUADALAJARA, JALISCO, FEBRERO 1992

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ESTUDIO COMPARATIVO DE CINCO TECNICAS SEROLOGICAS PARA EL-
DIAGNOSTICO DE LA BRUCELOSIS CAPRINA

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:
P.M.V.Z. JORGE TORRES AGUILAR

DIRECTOR DE TESIS: M.V.Z. VICTOR MANUEL MENDOZA GOMEZ

GUADALAJARA, JALISCO FEBRERO /92

I N D I C E

	PAGINA
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
JUSTIFICACION.....	19
HIPOTESIS.....	20
OBJETIVOS.....	21
MATERIAL Y METODOS.....	22
RESULTADOS.....	26
DISCUSION.....	29
CONCLUSIONES.....	33
BIBLIOGRAFIA.....	34

A G R A D E C I M I E N T O S

DOY GRACIAS A DIOS POR LA VIDA Y LA SALUD QUE HASTA HOY -
ME HA PERMITIDO.

A MIS PADRES:

QUIENES SIEMPRE ME DEPOSITARON SU CONFIANZA PARA LA TER-
MINACION DE MI CARRERA.

A MI HERMANO PEDRO, POR SU VALIOSA COOPERACION.

A MI DIRECTOR DE TESIS:

M.V.Z. VICTOR MANUEL MENDOZA GOMEZ, POR SU DESINTERESADA
AYUDA EN LA ELABORACION DE ESTA TESIS.

A LA Q.F.B. CRISTINA MORAN SALAS

POR SU GRAN APOYO.

AGRADEZCO LA COLABORACION DEL INSTITUTO NACIONAL DE REFE-
RENCIA EPIDEMIOLOGICA Y DE UNA MANERA MUY ESPECIAL A LA-
DRA. AIDE LOPEZ MERINO.

A MI AMIGA LOURDES CASILLAS LOZA POR SU COLABORACION, AYUDA Y PACIENCIA EN LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO.

A LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA:

A LA CUAL ME HONRO PERTENECER.

A LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA:
POR HABERME FORMADO EN MI CARRERA.

A MI H. JURADO.

M.V.Z. DAVID AVILA FIGUEROA

M.V.Z. JOSE LUIS DE LA TORRE COVARRUBIAS

M.V.Z. DAVID LICEAGA RIVERA.

A MIS MAESTROS:

POR SUS ENSEÑANZAS EN BENEFICIO DE MI FORMACION PROFESIONAL.

A MIS COMPAÑEROS.

A MIS AMIGOS.

RESUMEN

La brucelosis caprina continúa siendo un problema de salud pública por lo cual es necesario conocer y aplicar diferentes técnicas y antígenos sensibles y específicos para la detección de las diferentes formas lisas (B. abortus, B. melitensis, B. suis) y Rugosos (B. canis, B. ovis) para el diagnóstico serológico.

Se evaluaron las diferentes técnicas serológicas: - Prueba de la tarjeta, HUDDLESON, aglutinación estándar en tubo, aglutinación estándar en tubo modificada con EDTA y se empleó el antígeno liso de Brucella abortus 1119-3 y el antígeno rugoso de Brucella canis R M 6/66 y se compararon los títulos entre sí.

De 134 sueros trabajados, 18 de ellos reaccionaron a diferentes titulaciones en las pruebas serológicas en sus formas lisas y 133 sueros reaccionaron a las mismas pruebas pero en sus formas rugosas.

Se observó que el uso del ácido etilendiamino-tetraacético (EDTA) disminuyó las titulaciones positivas a Brucella registradas con las demás pruebas serológicas lo --

grando con ésto la disminuci3n de t3tulos falsos positivos.

Esto lleva a la conclusi3n de que se deben utilizar ant3genos purificados y por especie, para poder detectar anticuerpos antibrucella espec3ficos, con lo que se evitar3n los falsos positivos y negativos.

INTRODUCCION

La Brucelosis continúa siendo un problema de Salud-Pública en México y en el mundo, debido al consumo de leche y sus derivados no pasteurizados que es una práctica muy extendida en el país, además de contacto directo al penetrar a través de la piel y conjuntiva, ocasionando cuadros clínicos febriles (1, 8, 42).

En los animales domésticos, se considera uno de los principales agentes etiológicos de aborto infeccioso; en cabras y ovinos se reporta además, diferentes grados de mastitis, nódulos en glándula mamaria y artritis, la producción de leche disminuye (1).

El género Brucella, es un organismo patógeno intracelular facultativo, es un cocobacilo Gram negativo de 0.5 - 0.7 micras de diámetro por 0.6 - a 5 micras de longitud, no producen cápsula, no son móviles ni producen flagelos, algunas cepas requieren la suplementación de CO₂ para su crecimiento especialmente en el primo-aislamiento, (1, 2, 3, 4, 24).

Las formas lisas (Brucella abortus, Brucella melitensis, Brucella suis, Brucella neotomae) son colonias --

translúcidas y redondeadas de borde completo y de superficie lisa y brillante, de una opalescencia blanca azulada - con la luz reflejada, o bien de color amarillo pálido tras lúcido bajo la luz transmitida (8, 10, 11).

Las formas rugosas y/o mucoides, (Brucella canis, - Brucella ovis) producen colonias que a menudo son más grandes que las lisas y tienen una superficie granulada o viscosa. El color de las colonias varía entre blancuzco y pardo bajo la luz transmitida o reflejada en las colonias -- (8, 10, 11).

Para la identificación es fundamental definir el estado de disociación de los cultivos, ya que por lo general las características serológicas, la sensibilidad de los fagos y la virulencia se alteran drásticamente en las fases mucoide y rugosa.

La temperatura óptima de crecimiento es de 37°C. - pH de 6.6 7.4, catalasa y oxidasa positivas, algunas cepas pueden ser oxidasa negativas, no lisan los eritrocitos y son negativos a la prueba de rojo de metilo (Voges-Pros -- Kauer Test). (8, 10, 11, 24).

La pared celular de la Brucella está cubierta de --

una membrana interna y de una externa, separadas por espacio periplásmico, contiene una capa rígida de peptidoglucano asociada a la membrana externa (8). Algunos investigadores, reportaron el aislamiento de Brucellas con la pared celular modificada denominándose como formas L, debido al posible uso indiscriminado de antibióticos, sin embargo se desconoce su virulencia en la infección. (9).

Para establecer un diagnóstico de la Brucelosis, presenta dificultad cuando no es posible aislar el microorganismo en el cultivo bacteriológico, por lo que se recurre al empleo de pruebas serológicas y las medidas por células para medir la respuesta inmune. La magnitud y duración de éstos, dependerá en la virulencia de la cepa infectante, la cantidad del inóculo, sexo, gestación especie y estado inmunológico del huésped (8).

La dificultad de detectar la infección durante el período de incubación o en estados crónicos de la enfermedad; los títulos de anticuerpos, frecuentemente son irregulares ya que caen a niveles bajos y fluctúan durante períodos indefinidos. Particularmente en la Brucelosis se presenta la dificultad de distinguir anticuerpos producidos por vacunación con la cepa REV-1- de Brucella melitensis.

Los principales antígenos hasta ahora identificados para el diagnóstico de la brucelosis, son los lipopolisacáridos (8, 21, 26), tres grupos de proteínas de membrana externa de diferente peso molecular, que se encuentran en estudio para producir inmunidad protectora (36, 39, 41); - hápteno nativo (15, 18); el polisacárido B (15, 31); y -- veinte antígenos intracitoplásmicos (8); correspondientes a las formas lisas y rugosas.

En México, se utiliza la bacteria completa con los lipopolisacáridos presentes, como el único antígeno utilizado en el diagnóstico serológico, participa en las pruebas de aglutinación en placa y tubo, tarjeta, Rosa de Bengala, anillo de leche, Huddleson, fijación de complemento y recientemente en la prueba de ELISA, que se encuentra en estudio para su aplicación; además del polisacárido B, que diferencia a los animales infectados de los inmunizados -- (5, 31).

Los lipopolisacáridos como primer capa externa de la Brucella producen reacción cruzada con diferentes microorganismos como Yersinia enterocolitica serotipo 09, -- Escherichia coli y Salmonella entre otros, debido a que poseen antígenos comunes (6, 12, 18 y 21).

La inmunidad mediada por las células, se relaciona con la reacción de hipersensibilidad retardada, que se produce en animales sensibilizados por cualquier especie de Brucella al administrar intradérmicamente un alérgeno denominado Brucelina, que es un extracto antigénico de las proteínas de membrana interna, no deberá contener lipopolisacáridos y proteínas de membrana externa, ni de inducir una reacción de sensibilización, ni de incrementar el título de anticuerpos en animales no sensibilizados, esta prueba de intradermoreacción es utilizada en países de Europa (8).

La Brucelosis en las cabras es una enfermedad de -- tipo sexual, con aborto en el último tercio de la gestación como principal síntoma; y animales sexualmente inmaduros -- son resistentes.

La primer descripción de la enfermedad fue reportada por Polding en 1940 (35) quien reportó pirexia, severa mastitis y artritis, estos síntomas se observan sólo cuando el animal es infectado por una gran cantidad de cepas virulentas.

La infección entra usualmente por vía nasofaríngea o por la penetración de la piel que puede ocurrir si exis-

te alguna abstracción.

La bacteria es fagocitada por macrófagos, células efectoras del sistema inmune, además por anticuerpos y linfocitos T, o bien se multiplica intracelularmente y se libera para seguir infectando a más células, produciéndose con esto una nueva bacteremia.

Si el animal está preñado la bacteria invade el útero y se multiplica rápidamente en la placenta y en algunas ocasiones en el feto (8).

Cuando la infección progresa en las hembras, se observan que los microorganismos desaparecen del sitio de la infección poco después de la exposición, la bacteremia es prolongada y las bacterias reaparecen en el aparato genital aproximadamente al tercer mes de la gestación. Para que se produzca el aborto, debe existir una acumulación suficiente de bacterias y exudado que provoque la necrosis de la placenta y la separación de las carúnculas. (1,8).

La consecuencia fundamental de la infección, por lo general no es el aborto si no una placentitis que interfiere en la nutrición fetal y trae como resultado productos con menor peso al nacer.

Cuando la cabra no ha sido preñada la infección puede establecerse en alguna parte del sistema inmunocompetente, esto es de gran importancia epizootiológica después de una respuesta serológica negativa y la infección entra en una fase inaparente y produce problemas en el diagnóstico.

En cabras y ovejas la excreción de la Brucella melitensis a través de la vagina es más prolongada, que en el caso de las vacas infectadas por Brucella abortus dura de 2 a 3 meses en cabras y 64 días como límite como lo reportó ENTESSAR y colaboradores (17).

Los machos son más sensibles a la infección y más activamente responsables de la transmisión que las hembras; constituyen además el reservorio para la persistencia de la enfermedad. La fuente de las bacterias es el semen contaminado que excretan los machos infectados (8).

La infección es además por vía nasofaríngea lo que puede ser de importancia ya que los machos suelen hosiquiar los órganos genitales de los otros animales.

La infección Brucella en el macho produce efectos perjudiciales en la calidad del semen, en la eficiencia y capacidad reproductora del animal. A la disminución de la-

fertilidad y la degeneración seminal siempre le preceden - la aparición de lesiones como la orquitis (1, 8).

Sólo se puede hacer un diagnóstico inequívoco de la infección por Bruceella mediante el aislamiento y la identificación de la bacteria. No obstante, en muchas circunstancias en las que no es posible efectuar la investigación bacteriológica, el diagnóstico tendrá que basarse en métodos serológicos. Algunos de los métodos serológicos que se conocen en la prueba de aglutinación en placa, que es una modificación de la en tubo del DAEVA (DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA DE LOS ESTADOS UNIDOS AMERICANOS), adaptada para la detección de aglutinación rápida sobre una placa de vidrio. Alton y colaboradores han descrito las técnicas y formas de interpretación, la ventaja es ser una prueba sencilla y más rápida que la de aglutinación en tubo, pero resulta afectada por las condiciones del medio.

No se recomienda el empleo de la prueba de aglutinación en placa, excepto cuando el suero es de calidad inferior (2, 8, 23, 32, 33, 35).

La prueba de Rosa de Bengala se emplea como prueba de preselección para el diagnóstico individual, detecta la

infección más rápido que la prueba de fijación de complemento, elimina en muchos casos los bajos títulos serológicos de la prueba de aglutinación estándar en tubo y raramente los falsos positivos; es sensible en animales vacunados con cepa REV-1 aunque no está bien establecido; la concentración celular del antígeno empleado es del 5% a un pH neutro con el colorante de Rosa de Bengala de acuerdo al método establecido por el Central Veterinary Laboratory New Haw, Weybridge U.K (27).

La prueba de aglutinación estándar en tubo, es el procedimiento usado para determinar la cantidad de anticuerpos contra Brucella. Se usó un antígeno de Brucella abortus, hay diversos procedimientos, pero en general se emplean los métodos Europeos a el del DAEVA (DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA DE LOS ESTADOS UNIDOS AMERICANOS).

Con la prueba en tubo se mide la cantidad total de anticuerpos aglutinantes; la desventaja es que produce reacción a las aglutininas posteriores a la inmunización y en ocasiones a las estimuladas por antígenos heteroespecíficos.

La prueba de 2-mercaptoetanol, inactiva la inmunoglobulina IgM-1 presente en el suero debido a que rompe --

los fuentes de disulfuro, no detectan la inmunoglobulina - IgG en animales con infección crónica, reduce o elimina los falsos positivos con respecto a la prueba estándar en tubo y Rosa de Bengala (8, 24).

La prueba de antiglobulina de COOMBS, es utilizada en suero de animales de un título serológico negativo, sospechoso o de respuesta incompleta de la prueba de aglutinación estándar en tubo, debido a la presencia de anticuerpos incompletos en el suero; esta prueba revela con gran sensibilidad los anticuerpos IgG-1 e IgG-2; no es utilizada en animales vacunados con la cepa REV-1 porque los títulos se detectan durante más tiempo que en la prueba de aplicación de complemento después de la vacunación (16,44).

La prueba de fijación de complemento, se considera en la actualidad como la prueba más fiable para el diagnóstico individual de uso ordinario en bovinos. Es relativamente insensible a los anticuerpos que resultan de la inmunización con vacuna de cepa 19. Se puede disminuir el volumen de trabajo causado por la complejidad técnica de la prueba de fijación de complemento usándola sólo como prueba definitiva con muestras que han dado resultados positivos en pruebas preliminares de selección (3).

La actividad de aglutinación de la Brucella en el suero de una elevada producción de bovinos no infectados, que reacciona en la prueba de aglutinación en tubo, es inestable en presencia de la sal sódica del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Estas aglutinaciones EDTA-lábiles se asocian principalmente con moléculas de IgM, si bien en una pequeña proporción de animales también puede intervenir la IgG. Estas inmunoglobulinas se unen a los microorganismos de Brucella a través del fragmento Fc de sus 7s subunidades y no mediante el sitio de combinación de anticuerpos localizados de sus fragmentos Fab, esta interacción es bloqueada por el EDTA (8), las aglutinas de este tipo tal vez intervengan en el 70 a el 80% de las reacciones de aglutinación producidas por sueros de bovinos con reacciones negativas a fijación de complemento con respecto a Brucella.

En los sueros que la actividad de aglutinación es totalmente atribuible a las aglutinas EDTA lábiles, se producirá una pérdida completa, o casi completa de las titulaciones en presencia del agente quelante. No obstante, muchos sueros contienen una mezcla de aglutininas EDTA lábiles y anticuerpos estables ante el ácido y representarán sólo una reacción parcial de las titulaciones en presencia

del EDTA. Estas reacciones deben interpretarse a la luz de elementos confirmatorios o proporcionados por los antecedentes del rebaño y por otras pruebas serológicas y de cultivo (14, 20, 31). Existen otras reacciones de aglutinación causadas por *Ac.* que reaccionan en forma cruzada con otros microorganismos, debido a los lipopolisacáridos a fines -- entre sí (8).

En la actualidad se encuentra en estudio la aplicación de la prueba de ELISA para el diagnóstico de la *Bruce* *lo* *sis* *caprina*.

La prueba de aglutinación estándar en tubo adicionada con el EDTA fue descrita por primera vez por SCHEIBNER en 1976; NEILSEN y Col. en 1979, Mac. Millan (1985); GARIM y TRAP en 1985; NOWLAN de GENS en 1985; P.F. NOULAN en -- 1988.

En un estudio realizado por NIELSEN y Cols. (1979) para la detección de anticuerpos contra *Brucella abortus* en 559 sueros de bovinos, encontraron que el 80% de las -- reacciones a la prueba de aglutinación estándar en tubo modificada con EDTA así como la prueba de fijación de complemento resultaron negativos, estos sueros de bovinos --

fueron vacunados o aparentemente infectados cuando se realizó la prueba.

GARIN y Cols. para valorar la prueba de seroaglutinación para el diagnóstico de la Brucelosis bovina probaron 300 sueros con las pruebas de aglutinación estándar en tubo, aglutinación estándar en tubo modificada en EDTA y la prueba de fijación de complemento, concluyeron que el uso del antígeno modificado por el DTA en la prueba de aglutinación estándar en tubo no aumentó la titulación en las reacciones cruzadas en sueros infectados por Brucella abortus, aunque sí las aglutinaciones específicas aún sin contar con una explicación. (20).

NOWLAN y Cols. (1985) probaron 32 sueros de bovinos infectados con cepa de Brucella abortus 45/20 para conocer si se alteró su titulación al utilizar el antígeno modificado por el EDTA en la prueba de aglutinación estándar en tubo, no tuvieron resultados positivos a las aglutininas EDTA labiales por lo que concluyeron que el uso de este antígeno no altera significativamente las reacciones de aglutinación debidas a la infección por Brucella abortus.

En el estudio realizado por MAC MILLAN y Cols.(25),

para conocer la importancia en el uso de la prueba de aglutinación estándar en el tubo modificada por EDTA en el control de la Brucelosis bovina se trabajaron 977 muestras de suero sanguíneo y se encontró el 64% de sueros positivos - a títulos mayores de 1:100 con prueba de aglutinación estándar en tubo, pero estos porcentajes fueron reducidos en su titulación a menos de 1:100 al usarse la prueba de aglutinación estándar en tubo modificada con EDTA.

WANGELA, demostró que al utilizar en cabras 4 pruebas para el diagnóstico de Brucella melitensis, observó -- que la prueba de Rosa de Bengala fue la más sensitiva y la prueba de inmunodifusión en el gel la más específica esto en comparación con la prueba de fijación de complemento y la prueba de aglutinación estándar en tubo proporciona pequeña información cuando es utilizada con otras pruebas -- (40).

Herrera-Mtz, evaluó 500 sueros caprinos de 6 explotaciones con problemas de tipo reproductivo con los antígenos de tarjeta (B. abortus 1119-3 L a pH 3.5) aglutinación con Rosa de Bengala a pH 7.0 (B. abortus 45/20 R y B. melitensis B.115 R en forma independiente), los resultados que obtuvieron 56 sueros positivos al antígeno B. --

abortus 1119-3 L; 109/54 para B. abortus 45/20 R y B. melitensis B 115 R con Rosa de Bengala a pH 7.0 respectivamente y encontraron evidencia serológica de especie y biotipo diferentes a B. abortus en su forma lisa, por lo que se demuestra serológicamente la presencia de B. abortus y B. melitensis en sus formas rugosas. (22).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La serología es la base para el diagnóstico de la Brucelosis en los animales domésticos, para el control y erradicación de la enfermedad.

Existen datos sobre el avance en el diagnóstico de la Brucelosis bovina, a través de estudios realizados en caminados a la estandarización de métodos tradicionales y la aplicación de nuevas técnicas serológicas.

Desafortunadamente no existen datos de pruebas serológicas eficaces para el diagnóstico de la Brucelosis caprina, por lo que existen discrepancias en los resultados obtenidos al desconocerse en los trabajos publicados el antígeno utilizado como "ideal" y por ser evaluados mediante una sola prueba en animales sospechosos de infección.

JUSTIFICACION

Es importante que los animales en los centros de producción pecuaria estén libres de enfermedades infecciosas debido a que tienen un efecto negativo en la productividad de los mismos, en el caso de la Brucelosis estos efectos pueden ser: Pirexia severa, mastitis y artritis, placentitis, etc. que se traducen en pérdidas económicas para el productor (8, 17, 34).

Por lo que es necesario la aplicación de pruebas serológicas específicas y sensibles para el diagnóstico de la Brucelosis caprina ya que es una práctica común el utilizar en forma rutinaria una sola técnica, lo que ocasiona en su interpretación falsos positivos y/o negativos por lo que resultará de gran utilidad comparar las diferentes técnicas entre sí.

HIPOTESIS

Con la técnica de aglutinación estándar en tubo modificado por el EDTA, la especificidad se incrementa en un 80% con relación a las pruebas de aglutinación estándar en tubo, 2 mercaptoetanol, tarjeta, y Huddleson ya que ésta elimina anticuerpos inespecíficos.

OBJETIVOS

GENERAL.

Evaluar las diferentes técnicas serológicas utilizadas en el diagnóstico de la Brucelosis caprina, empleando el antígeno liso de Brucella abortus 1119-3 y el antígeno rugoso de Brucella canis RM 6/66(*), en comparación con el aislamiento microbiológico, en cabras sacrificadas en el Rastro Municipal de Guadalajara.

PARTICULARES.

Comparar los títulos serológicos de la prueba de aglutinación estándar en tubo modificada con EDTA, con los obtenidos en las pruebas de aglutinación estándar en tubo, 2 mercaptoetanol, Huddleson y tarjeta.

(*) Antígeno Brucella canis RM 6/66: cepa tipo de referencia (R: rugosa; M: mucoide; 6: mes de junio; 66: 1966)

MATERIAL Y METODOS

Se recolectaron al azar 134 muestras de suero sanguíneo y de secreción vaginal de cabras sacrificadas en el rastro Municipal de la ciudad de Guadalajara, en el periodo comprendido de 1990 - 1991.

Las muestras se trabajaron por triplicado en el -- Area de Bacteriología del Departamento de Medicina y Salud Pública de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Guadalajara, para la determinación de aglutininas anti Brucella.

Los antígenos usados en las pruebas serológicas de aglutinación estándar en tubo, 2- mercaptoetanol y estándar en tubo presencia del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), fue una suspensión de Brucella abortus cepa 1119-3 de la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRO-NABIVE), para la detección de anti-cuerpos contra las células lisas y el antígeno de Brucella canis cepa RM 6/66. - para las células rugosas.

Aglutinación estándar en tubo. El procedimiento fue de acuerdo al método descrito por ALTON y LOPEZ MERINO - -

(2,3,4,24), se emplearon diluciones del suero en solución-salina 5% y fenol al 0.5% como diluyentes, en una serie de tubos (13 X 100 mm), iniciando por una dilución 1:20 y finalizando 1:320. Se añadió a cada tubo un volumen igual -- (0.5 ml) de una dilución 1:100 de la suspensión original - del antígeno de Brucella abortus cepa 1119-3: los tubos se agitaron vigorosamente, se incubaron a 37° por 48 horas se efectuó la lectura sin agitar los tubos en cada prueba se incluyó un suero control positivo y un negativo.

Para la detección de anticuerpos contra las células rugosas, se preparó una solución A (salina formalizada): - 10 ml. de formaldehído en 90 ml. de NaCl. al 0.85% y una - solución B: NaCl. (3.5% p/v) en 100 ml. de agua destilada; la dilución del suero se realizó en la solución B, como - diluyente de la misma manera que para las lisas.

En la dilución del antígeno, se preparó el diluyente al agregar 0.6 ml. de la solución salina formalizada en 99.4 ml. de la solución B y 4.4. ml. de la solución diluyente. (24).

Aglutinación en tubo en presencia de 2-mercaptoetanol. Este método se desarrolló de la misma forma que para-

la anterior, con las diferencias siguientes: el diluyente se empleó en una solución de 2-mercaptoetanol al 0.1 M, el antígeno se diluyó 1:100 para las células lisas, para las rugosas fue de acuerdo al procedimiento anterior. La incubación y lectura se efectuaron de la misma manera. (24).

Aglutinación estándar en tubo modificada con EDTA.- Se realizó de acuerdo a la prueba normal de aglutinación estándar en tubo, se empleó un diluyente constituido, por una sal sódica (ácido etilendiaminotetraacético), en una proporción de 10 mml. y por litro de solución tamponada -- con fosfatos, a un pH de 7.2, en lugar de solución salina-fenolizada; las condiciones de incubación y lectura de la prueba son las mismas a los procedimientos anteriores para las células lisas, como para las rugosas, (8,20,29).

Se determinó la aglutinación por la formación de una capa de células depositadas en el fondo del tubo y la clarificación del sobrenadante.

La aglutinación fue negativa a la no clarificación del sobrenadante, aún cuando las bacterias se depositaran en el fondo del tubo, formando un botón uniforme.

Prueba de tarjeta. Se empleó el antígeno de Bruce -

lla abortus cepa 1119-3 (PRONABIVE), teñido con Rosa de -- Bengala.

Prueba de Huddleson. Se utilizó un antígeno comercial (Bigaux).

En las dos pruebas anteriores, como métodos rápidos de aglutinación en placa; se realizó la lectura a los 4 - minutos, para después tomarse como negativa la prueba en - ausencia de aglutinación.

Para el aislamiento microbiológico a partir de se-- creciones vaginales, se sembraron por duplicado en el me - dio de Farell (24). El medio base fue Agar Casoy (MERCK), - adicionado de glucosa al 1.5%, 5% de sangre de equino y -- una placa se incubó a 37°C durante una semana en una atmós - fera normal y la otra en presencia de CO₂ al 5%. (24).

RESULTADOS

De un total de 134 sueros de cabras trabajados, al emplear el antígeno de Brucella abortus 1119-3 para la detección de anticuerpos contra las formas lisas reaccionaron un total de 18 sueros a diferentes titulaciones de las cuales sólo el 4.4% resultó positivo a Brucelosis en las diferentes técnicas empleadas como se demuestra en el cuadro No. 1, esto tomando en cuenta que las titulaciones 1:20 1:40, 1:80, sólo se consideran sospechosas y las titulaciones 1:160 y 1:320 positivas.

Para la determinación de anticuerpos antibrucella contra las formas rugosas se utilizó el antígeno de Brucella canis RM 6/66, resultando 133 sueros positivos a la prueba de aglutinación estándar en tubo a diferente titulación, en la aglutinación estándar en tubo con EDTA, reaccionaron 113 sueros y 19 sueros reaccionaron a la presencia de 2-mercaptoetanol como se demuestra en el cuadro No. 2.

Con respecto a los cultivos bacteriológicos de las secreciones vaginales, hubo crecimiento de colonias bacterianas que no respondieron a todos los esquemas de identificación bioquímica.

CUADRO No. 1

COMPARACION DE LOS TITULOS OBTENIDOS EN 134 SUEROS EMPLEANDO EL Ag DE
B. abortus 1119-3

TITULO	No. SUEROS	AET	2M	EDTA	TARJETA	HUDDLESON
1:20	9	9	--	--	1	5
1:40	4	4	--	--	--	2
1:80	2	2	1:40	--	1	1
1:160	2	2	--	--	--	2
1:320	1	1	1	--	1	1
POSITIVOS	18	18(13.4%)	2(1.4%)	0	3(2.2%)	11(8.2%)
NEGATIVOS	116	116	132	134	131	123
TOTAL	134	134	134	134	134	134

CUADRO No. 2

COMPARACION DE LOS TITULOS OBTENIDOS EN 134 SUEROS EMPLEANDO EL Ag de-
B. canis RM 6/66

TITULOS	No. SUERO	AET	2M	EDTA
1:20	3	3	--	--
1:40	1	1	--	--
1:80	12	12	1	--
1:160	19	19	2(1:20)	6(1:20)
				9(1:40)
				4(1:80)
1:320	98	98	2(1:20)	20(1:20)
			1(1:40)	27(1:40)
				36(1:80)
			1(1:160)	9(1:160)
			12(1:320)	2(1:320)
POSITIVOS	133	133(99.2%)	19(14.1%)	113(84.3%)
NEGATIVOS	1	1	115	21
TOTAL	134	134	134	134

DISCUSION

Para lograr el diagnóstico serológico de la infección, se ha demostrado que el elemento clave para llegar al objetivo es el empleo del antígeno sensible y específico (18).

Para detectar todos los casos de Brucelosis con respecto a la especie, deberán utilizar las diferentes estructuras antígenas de la bacteria para no obtener resultados falsos positivos con respecto a infecciones bacterianas -- como Escherichia coli, y otros coliformes como lo reporta SARVAMANGALA (37).

El empleo de las diferentes técnicas serológicas para la detección del anticuerpo contra la Brucella se ha -- desarrollado al utilizar a la bacteria completa como el antígeno para las diferentes pruebas serológicas, por lo que la parte medular del trabajo es la comparación de los diferentes métodos tradicionales en tubo y placa en presencia de 2-mercaptoetanol y aglutinación modificada por el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) con los antígenos -- para las formas lisas de Brucella abortus 1119-3 actualmente utilizado en México como el antígeno oficial y el antígeno para las formas Rugosas de Brucella canis RM 6/66, -- los resultados indicaron que el antígeno de Brucella abor-

tus fue de menor sensibilidad y especificidad en comparación con el antígeno de Brucella canis que fue más sensible y específico, mismos resultados se han confirmado en un estudio similar realizado por Herrera-Mtz. en cabras -- con problemas de infertilidad y aborto (22).

Los resultados de los títulos serológicos obtenidos al emplear las diferentes pruebas y el único antígeno resultan similares a los reportados por WANGLELA (4)), que -- indicó que las cabras infectadas desarrollan diferentes -- reacciones a las clases de anticuerpos y pruebas serológicas empleadas debido a que los reservorios son totalmente diferentes entre sí.

También se ha descrito que un gran número de reacciones positivas a la SAT de animales no infectados fueron sensibles a la acción del EDTA, porque esos sueros contenían moléculas de IgM que causan aglutinación con el antígeno de Brucella abortus, de una manera no inmune de acuerdo a los enlaces de la fracción Fc y estos enlaces son -- inhibidos por el EDTA, ésto también fue probado por NIELSEN (29); GARIN (20); MAC MILLAN (25), NOWLAN (30).

Por eso la importancia de la sensibilidad y especi -

ficidad del EDTA para eliminar o disminuir la titulación positiva a brucella detectadas en otras pruebas serológicas (falsas positivas), DEGENS (14) también reportó este hecho.

La correlación de los títulos serológicos entre sí con las distintas pruebas serológicas, demostró que el utilizar un solo antígeno de Brucella que utiliza a la bacteria completa, de pié para que los resultados obtenidos no sean los esperados, lo que pone en duda la credibilidad que existe para estas pruebas, pero con el empleo de la prueba de aglutinación estándar en tubo modificada con EDTA resultó ser de mayor sensibilidad y especificidad y el haber empleado el antígeno de la cepa rugosa de Bruce lla canis RM 6/66 se obtuvieron un mayor número de sueros que reaccionaron positivamente a la detección de anticuerpos contra Brucella en su forma rugosa.

En cuanto al crecimiento bacteriológico, las colonias que resultaron sospechosas, respondieron a la mayoría de los esquemas de identificación bioquímica, pero falló a la prueba de urea, lo que sugiere se deba a cepas de Brucella atípicas, además de ésto se careció de anti sueros monoespecíficos y fagos para su confirmación.

Se elaboró el antígeno de Brucella canis RM 6/66 de acuerdo a la metodología propuesta por el Laboratorio Central Veterinario de WEYBRIDGE, INGLATERRA (10) para trabajar diluciones iniciales de 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320; para el Antígeno de Brucella abortus 1119-3, se trabajaron diluciones verdaderas, pero se utilizaron las diluciones anteriores para simplificar la comparación de los títulos en ambas pruebas cuando se emplearon los dos diferentes antígenos.

CONCLUSIONES

- 1.- Con el uso de la prueba de aglutinación estándar en tubo modificada con EDTA se aumentó la especificidad en un 87% en comparación con las pruebas de aglutinación estándar en tubo y 2 mercaptoetanol.
- 2.- El antígeno de Brucella abortus 1119-3 fue de menor sensibilidad y especificidad en comparación con el antígeno de Brucella canis RM 6/66
- 3.- No se pudo confirmar la clasificación para el género de Brucella, de las cepas aisladas a partir de secreciones vaginales por carecer de antisueros monoespecíficos para B. abortus, B. melitensis y B. rugosus además de los Bacteriófagos Bk (Berkeley) y Tb (Tbilisi).

En el presente trabajo se demuestra que la Brucelosis caprina constituye como un problema importante de Salud Pública en México, siendo necesario el realizar trabajos de investigación para determinar la magnitud del problema.

BIBLIOGRAFIA

1. ALTON, G.; JONES, L.M. and PIETZ, D.E.: Laboratory -- Techniques in Brucellosis. O.M.S., Geneva (1975).
2. ALTON, G.; JONES, L.M. And PIETZ, D.E.: La Brucellose. Techniques de Laboratoire. 2me ED.. O.M.S., Geneva - - (1977).
- 3.- ALTON, G.G.: The epidemiology of Brucella melitensis - in sheep and goats. Brucella melitensis. A seminary in THE CEC PROGRAMA OF COORDINATION OF RESEARCH ON ANIMAL PATHOLOGY, HELD IN BRUSSELS AT THE COMISSION OF THE - EUROPEAN COMUNITIES, 14-15 November (1984).
- 4.- ALTON, G.G.; JONES ANGUS, R.D. and VERGER, J.M.: Tech- nique for the Brucellosis Laboratory INRA, Paris (1988)
- 5.- ANGULO-BLANCO, GUADALUPE y SANTOSCOY EMMA.: Detección de anticuerpos contra Brucella en caprinos utilizando antígeno Poly B. Dpto. de Bact. Fac. Med. Vet. y Zoot. UNAM.
Dirección General de Sanidad Animal-SARH,TECAMAC, Méxi- co. Resumen del XVII Congreso Nacional de Microbiolo- gía, Acapulco Gro. (1987).

- 6.- BUNDLE, D.R.; GINEY M.A.J; PERRY, M.B.; DUNCAN, J.R. - and CHERWONOGRODZKY, J.W.: Serological confirmation of Brucella abortus and Yersinia Enterocolitica O9 o-antigens by monoclonal antibodies. Infect. Immun. 46 (2);- 389-393 (1984).
- 7.- CARLSSON, H.E.; HURVELL, B. and LINDBERG, A.A.; Enzyme-Linked Immuno sorbent Assay (ELISA) for titration of antibodies against Brucella abortus and Yersinia enterocolitica.
Acta Path. Microb. Scand., 84; 168-176 (1976).
- 8.- COMITE MIXTO FAO/OMS de expertos en Brucellosis. Sexto informe (1986).
- 9.- CORBEL, M.J.; SCOTT, A.C. and ROSS, H.M.: Properties of a cell wall-detective variant of Brucella abortus of bovine origin. J. Hyg. 85: 103-113 (1980).
- 10.- CORBEL, M.J.; GILL, K.P.W. and REDWOOD, D.W.: Diagnostic Procedures for non-smooth Brucella strains. Central Veterinary Laboratory. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. U.K. (1979).

- 11.- CORBEL, M.J.; GILL, K.P.W. and THOMAS, E.L.: Methods for the identification of Brucella Booklet 2085. Central Veterinary Laboratory. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. U.K. (1983).

- 12.- CHURWV, C.C.: Diferentation of Brucella abortus and Yersinia enterocolitica serotipe 09 infections in cattle: the use of specific lymphocyte transformation -- and Brucellin skin test. Vet. Q. 9 (2): 134-142 (1987).

- 13.- DAVIES, G.: The Rose Bengal Test, Vet. Rec., 88: 447 - 449 (1971).

- 14.- DE GEMS, H. and NOWLAN, P.F.: Identification of non-specific agglutination to Brucella abortus using and EDTA Modified SAT. Vet. Rec. 123: 184 (1988)

- 15.- DIAZ, R.; TOYOS, J.; SALVO, M.S.; FERNANDEZ LAGO, L.; MORIYON ALONSO I and DORRONSORO, I.: Studies on the Polysaccharide B. and native hapteme of Brucella and Yersinia Enterocolitica serotype 09. Dev. Biol. Stand. -- 56: 213-220 (1983).

- 16.- DIAZ, R. and LEVIEUX, D.: Role respectif en serologie de la Brucellose bovine des antigenes et des inminoglobulines G1 et G 2 dans les test d'agglutination, de Coobs et an Rose Bengale ainsi que dans le phenomene de zone. C.R. Acad. Sci., Paris 274: 1593-1596 (1972)
- 17.- ENTESSAR, F.; ARDALAN, A.; EBADI, A. and JONES, L.M.:-- Effect of living Rev. I vaccine in Producing long-term-immunity against. *Brucella melitensis* infection in -- sheep in Iran. J. comp. Path. 77:367-376 (1967).
- 18.- FARINA, R.: Curret Serological methods en B. melitensis diagnosis. Brucella melitensis a seminar in the cec-Programe of co-ordination of the european communities. 14-15 november 1984. Edited by J.M. VERGEL and M. PIOMMET, Institute National of the Reserche Agronomique. NOUZILLY, France 1985. MARTINUS NYHOFF, Publishers. A member fotherwer academic publisher group for the Comission of the europan communities. Boston/Van - laster. 1985.
- 19.- FERNANDEZ-LAGO, L.; MONIYON I,J. and DIAZ, R.: Immuno-logical identy of *Brucella* native haptten, Polisacharide B, and Yersinia enterocolitica serotype 09 native - HAPTE. Infect. Inmun. 38: 778-780 (1982)

- 20.- FLORES-CASTRO, RICARDO Y CARMICHAEL, LELAND E.: Caracterización de diferentes cepas de Brucella canis. Rev. Latamer. Microbiol. 28: 145-151 (1986).
- 21.- GARIM, B.; TRAP, D. and GAMMONT, R.: Assesment of EDTA-seroagglutination test for the diagnosis of bovine Brucellosis. Vet. Rec. 177: 444-445 (1985).
- 22.- GOMEZ-MIGUEL, M.J.; MORIYON. I. and LOPEZ, J.; BRUCE--LLA outer membrane lipoproteina shares antigenic determinans with Escherichia coli braun lipoproteina and -exposed on the cell surface.
Infect. Inmun. 55:
- 23.- HERRERA-MARTINEZ, D.I.: Determinación de anticuerpos -contra Brucella abortus y Brucella militensis en capri nos con problemas de infertilidad y aborto.
- 24.- LAMBERTH, G. and AMERANLT, T.E.: An evaluation of the-acidifies Plate, test antigens detecting bovine Bruce-llosis, Amer. Jour, Vet. Res., 23: 1031 (1962).

- 25.- LOPEZ-MERINO, AG.: Manual de técnicas y procedimientos para el estudio de la Brucellosis. Secretaría de Salud. México, D.F. (1987).
- 26.- MAC MILLAN, A.P. and COCKREM, D.S.: Reduction of non-specific Reaction to the Brucella abortus serum - - agglutination test by the addition of EDTA. Res. Vet. Sci. 38: 288-291 (1985).
- 27.- MORENO, E.; PITT, M.W.; JONES, L.M.; SCHURING, G.G. -- and BERMAN, D.T.: Purification and characterization of smooth and rough lipopolysaccharides from Brucella abortus J. Bacteriol. 138: 360-369 (1979).
- 28.- MORGAN, W.J.B.; MACKINSON, D.J. and CULLEN, G.A.: The rose Bengal Plate agglutination in the Diagnosis of - Brucellosis. Vet. Rec. 85 636-641 (1969).
- 29.- NICOLETTI, P.: Utilitation of the card test in Bruce llosis Eradication. J. Amer. Vet. Med. Ass. 151: 126
- 30.- NIELSEN, K. SAMAGH, B.S.; SPECKMANN, G. and STEMSSHORN, B.: The bovine Immune response to Brucella abortus, - elimination of some sporadic Serological Reactions by Chelation of Divalent Cations. can. J. comp. Med. 43: can. J. comp. Med. 43: 420-425 (1979).

- 31.- NOWLAND, P.F. and DE GEUS, M.: Use of EDTA Modified--
antigen in the serodiagnosis of bovine Brucellosis. -
Vet. Rec. 116:13: (1985).
- 32.- ONTIVEROS-CORPUS, M.L. y TENORIO G.V.R.: Avances en -
la utilización de la prueba RID con antígeno Polisacá
rido B. de Brucella melitensis cepa Rec. Para el diag
nóstico de la Brucelosis bovina. Resumen del XVII Con
greso Nacional de Microbiología, Puebla, Pue. 27 al -
30 de abril (1986).
- 33.- PIETZ, D.E. and SCHIF, E.A.: A rapid Brucellosis --
Card Test Using Buffered Brucella Antigen (BBA), Am.-
J. Vet. Res. 29 325-328 (1968)
- 34.- PILETCH; TOMA B. and ANDRE, G.: Diagnostic serologi -
que de la Brucellose par L'epreve a L'antigene Tam -
ponne (E.A.T.) ou card test. Cah. Med. Vet. 41: 5-19
(1972).
- 35.- POLDING, J.B.: Brucella melitensis infection in the--
maltese goat. J. Am. Vet. Med. Ass. 96: 30 (1940)

- 36.- ROSE, J.E. and ROEPKE, M.H.: An acidified Antigen --
for detection of non-specific reaction in the Plate--
agglutination Test for bovine Brucellosis. Amer. Jour.
Vet. Res. 18: 550 (1957)
- 37.- SANTOS, J.M.; VERTREATE, D.R.; PERERA, V.Y. and --
WINTER, A.J.: Outer membrane proteins from rough --
stains of four Brucella Species Infect. Immun. 46 (1)
188-194 (1984).
- 38.- SARVAMANGALA, J.N.DEVI; POLT, SARAH.S.; BOCTOR, FOVAD,
N. and JAMES B. PETER.: Serological evaluation of --
Brucellosis: Importance of species in Antigen Prepara-
tion. J. Infect. Dis. 156: 658-661 (1987).
- 39.- SCHEIBNER, E.: Spezifitätsgrenzen der Brucellose Langs-
amagglutination. Bertl. Munch. Tierärztl. Wschr. 89:-
300-302 (1976).
- 40.- VERTREATE, D.R.; CREAMY, M.T.; CAENEY, N.T.; BALDWIN,
C.L.; BLAB, M.W. and WINTER, A.J.: Outer membrane -
Proteins of Brucella abortus insolation and characte-
rization. Infect. Immun. 35: 1159-1167 (1982).

- 41.- WANGLELA, S.; WANDERA, J.G. and WAGNER, G.G.: Comparison of four serological test in the diagnosis of -- caprine Brucellosis. Res. Vet. Sci. 28: 168-171 (1980).
- 42.- WINTER, A.J.; ROWE, G.E.; DUNCAN, J.R.; EIS, M.J.; WINDON, J. GAMEM, B. and MOREIN, B.: Effectiveness of Natural and Synthetic Complexes of Porin and Poly Saccharide as vaccines Against Brucella abortus in mice. Infect. Immun. 56 (11): 2808-2817 (1988).
- 43.- WORLD HEALTH ORGANIZATION. JOIN FAO/WHO. Expert. Committee on Brucellosis. Fifth. report. world Health organization. Geneva. (1971).