

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



“DETECCION DE ANTICUERPOS Y AISLAMIENTO
MICROBIOLOGICO DE BRUCELLA OVIS EN OVINOS HEMBRAS
SACRIFICADOS EN EL RASTRO MUNICIPAL DE GUADALAJARA
DURANTE LOS MESES DE MARZO A SEPTIEMBRE DE 1991.”

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A
JUAN RAMON GALINDO BARAJAS
DIRECTOR DE TESIS M.V.Z.
VICTOR MANUEL MENDOZA GOMEZ
GUADALAJARA, JAL. MARZO DE 1992

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

" DETECCION DE ANTICUERPOS Y AISLAMIENTO MICROBIOLOGICO DE
BRUCELLA OVIS EN OVINOS HEMBRAS SACRIFICADOS EN EL RASTRO
MUNICIPAL DE GUADALAJARA DURANTE LOS MESES DE MARZO
A SEPTIEMBRE DE 1991."

T E S I S P R O F E S I O N A L
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A
JUAN RAMON GALINDO BARAJAS

DIRECTOR DE TESIS:

M.V.Z. VICTOR MANUEL MENDOZA GOMEZ

ASESOR DE TESIS:

CRISTINA MORAN SALAS.

GADALAJARA JAL. MARZO 1992.

AGRADECIMIENTOS

A. MIS MAESTROS:

Por la formación academica que me transmitieron con el unico fin de fortalecerme en forma profesional.

A LA Q.F.B. CRISTINA MORAN SALAS:

Por su asesoria en el desarrollo de mi trabajo de tesis y por la amistad que me brinda, gracias.

AL P. en M.C. VICTOR MANUEL MENDOZA GOMEZ:

Por brindarme su apoyo como Director de Tesis y transmitirme sus conocimientos profesionales.

CON TODO RESPETO AL H. JURADO:

M.V.Z. RUBEN LOEZA ELGUEROS.

M.V.Z. DAVID AVILA FIGUEROA

Q.F.B. CRISTINA MORAN SALAS.

DETECCION DE ANTICUERPOS Y AISLAMIENTO MICROBIOLÓGICO
DE BRUCELLA OVIS EN OVINOS HEMBRAS SACRIFICADOS EN EL
RASTRO MUNICIPAL DE GUADALAJARA DURANTE LOS MESES DE
MARZO A SEPTIEMBRE DE 1991.

DEDICATORIAS

A TI ESPOSA:

Por tu amor, apoyo y comprensión al soportar tantas carencias, infinitamente gracias. Comparto contigo la dicha de este momento que nó es solo mia es de los dos.

A MIS HIJOS: NIDIA, JUAN Y LUISITO, por su comprensión, paciencia y tomar un poco de tiempo que les coresponde para seguir superandome y forjarles un futuro mejor.

RESUMEN:

Se trabajaron 116 sueros sanguíneos e hisopos vaginales de ovinos hembras, estas muestras fueron recolectadas de animales que llegaron al Rastro Municipal de Guadalajara procedentes del Estado de Colima, y del Estado de Jalisco de la Región de Tlájómulo de Zúñiga, Tala, Tapalpa y periferia de Guadalajara de crias de traspatio.

Los sueros se trabajaron con las técnicas de diagnóstico para brucelosis y detectar anticuerpos contra B. ovis apoyandose en la prueba de Tarjeta, reacción de Huddleson, aglutinación estándar en tubo, estándar en tubo en presencia de 2 mercaptoetanol, -- estándar en tubo modificada con el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Se utilizó en antígeno de la cepa lisa B. abortus 1119-3 y de la cepa rugosa B. canis RM 6/66 para evaluar la sensibilidad y especificidad de ambos antígenos, a las secreciones vaginales se les practicó un cultivo bacteriológico utilizando el medio de Farell .

Del total de 116 sueros sanguíneos trabajados, 4, (2%) reaccionaron positivamente a las pruebas de reacción de Huddleson y a la de aglutinación estándar en tubo y estándar en tubo en presencia de 2 mercaptoetanol utilizando en antígeno B. abortus -- 1119-3.

Respecto a las titulaciones obtenidas trabajadas con el antígeno B. canis RM 6/66, reaccionaron 110 (95%) a la prueba de aglutinación estándar en tubo, 21 (18%) a la estandar en tubo en pre

sencia de 2 mercaptoetanol y 74 (64%) a estándar en tubo con EDTA. De acuerdo a los resultados obtenidos, la prueba aglutinación estándar en tubo modificada con EDTA, disminuyó hasta en un 40% los positivos respecto a las pruebas tradicionales .

Concluyendo que el EDTA adicionado a la prueba estándar en tubo es recomendable para eliminar los falsos positivos, resultado de las pruebas serológicas tradicionales, las cuales nó son recomendables en el diagnóstico de Brucella ovis por la presencia de anticuerpos heterólogos y la falta de técnicas para trabajar sueros sanguíneos en cada especie animal en el diagnóstico de la brucelosis.

Los cultivos bacterianos de las secreciones vaginales fueron negativos. esto lo podemos atribuir a, que si la hembra no se encontró preñada al momento de la infección la Brucella permanecera por mayor tiempo en el aparato reproductor y eliminara la bacteria con mas frecuencia para su aislamiento.

INDICE.

Página

Introducción	1
Planteamiento del problema	17
Justificación	18
Hipotesis	19
Objetivos	20
Material y métodos	21
Resultados	26
Discusión	31
Conclusiones	33
Bibliografía	34

INTRODUCCION:

La brucelosis es una enfermedad zoonótica que afecta a los animales domésticos, se transmite al hombre por ingerir productos lácteos no pasteurizados, por contacto directo a través de piel intacta ó conjuntiva, por inhalación de sustancias desecadas provenientes de animales infectados. Esta continúa siendo un problema de Salud Pública en México y en el mundo.

El género Brucella, es un organismo patógeno intracelular facultativo, es un cocóbacilo Gram negativo de 0.5 a 0.7 micras de diámetro y de 0.6 a 5 micras de longitud, no producen capsula no son móviles ni producen flágelos, la especie B. abortus requiere la suplementación de 10% de CO₂ para su crecimiento especialmente en el primer aislamiento (1,3,4,21).

Las formas lisas, (Brucella abortus, Brucella melitensis y Brucella suis son algunas colonias translúcidas redondeadas de borde completo, de superficie lisa y brillante o bien de color amarillo pálido translúcido bajo la luz transmitida (1,4,5,).

Las formas rugosas y/o mucoides, (Brucella canis y Brucella ovis), producen colonias que a menudo son más grandes que las lisas, tienen una superficie granulada o viscosa (1,5,8,).

Para la identificación es fundamental definir el estado de la disociación de los cultivos, ya que por lo general las características serológicas, la sensibilidad de los fagos y la virulencia alternan drásticamente en las fases mucoide y rugosa. La infección entra usualmente vía nasofaríngea o por la penetración a través de piel si existe alguna abrasión. La bacteria es fagocitada por macrófagos, células efectoras del sistema inmune ó

bien se multiplica intracelularmente con esto se produce una nueva bacteremia. Si el animal esta preñado la bacteria invade el útero y se multiplica rapidamente en la placenta y en algunas ocasiones en el feto (4).

Cuando la infección progresa en las hembras, se observa 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 al tercer mes de la gestación. Para que se produzca el aborto, debe de existir una a cumulación de bacterias y de exudado que provoque la necrosis y la separación de las carunculas (4). La consecuencia fundamental de la infección por lo general no es el aborto sino una placentitis que interfiere en la nutrición fetal y trae como resultado productos con menor peso al nacer. Cuando la oveja no ha sido preñada la infección puede establecerse en el sistema inmunocompetente esto es de gran importancia epizootiológica después de una respuesta serológica negativa la infección entra en una fase inaparente y hay problemas en el diagnóstico. En ovejas hembras la excreción de la Brucella melitensis a través de la vagina es más prolongada que en el caso de vacas infectadas por Brucella abortus dura aproximadamente 62 dias como lo reportó, Entesar y colaboradores (17).

La brucelosis ovina muestra más afinidad por el aparato reproductor de el macho que por el de la hembra, las consecuencias mas frecuentes y más graves por B. ovis en el macho son epididimitis y esterilidad (1,2). La fuente de las bacterias es el semen contaminado que excretan los machos infectados. La transmi-

sión pasiva vénerea es a través de una hembra común con la que ambos carneros machos se aparean con esa hembra en el mismo ciclo estral, al alojarse en cobertizos antes ocupados por carneros infectados, estos son más sensibles a la infección no así las hembras que resisten más a la enfermedad, además el macho constituye el reservorio animal para la persistencia de la infección. En animales jóvenes se ha encontrado hasta un 80% de los apareados presentan pruebas clínicas y serológicas de la infección. Se sospecha que la sodomía es forma principal de propagación entre carneros jóvenes, se ha logrado la transmisión experimental vía rectal. La infección nasofaríngea también es importante, ya que los carneros ociquean los genitales de otros machos (12).

Las ovejas hembras son más resistentes a la infección que los machos, al aparearse las hembras con los machos infectados rara vez se infectan en forma activa presentando titulaciones positivas en la prueba de fijación de complemento y en pocas ocasiones el contacto directo con el aborto transmite la enfermedad de una oveja a otra, aunque la hembra infectada excrete B. ovis durante 10 días aproximadamente se transmite la infección si se produce el estro en ese periodo. En ovejas inseminadas con semen infectado se produce vaginocervicitis transitoria, puede recurrir en el siguiente estro y aún después de la parición, las ovejas en este estado son transmisoras (1,2).

La infección de carneros produce efectos perjudiciales en la calidad de semen y en la eficiencia de la capacidad reproductora del animal. El semen de carnero infectado aún cuando no se obser-

van lesiones, contiene células epiteliales escamadas, detrito espermático, y B. ovis (1,2).

La disminución de la fertilidad y la degeneración seminal preceden la aparición de lesiones. En rebaños donde se han producido abortos la producción de crías es baja, de 100 a 25%. El 20% de hembras no son fecundadas y el 16% de corderos nacidos vivos mueren antes de 6 semanas de edad y se prolonga la temporada de parición por la interferencia en las operaciones de la cría (1,2).

En condiciones de infección natural en los carneros transcurre un periodo de 6 a 17 semanas entre la exposición y la aparición de lesiones, siendo la infección asintomática, las bacterias permanecen confinadas en este sitio además y en los ganglios linfáticos regionales, de 10 a 14 días antes que la enfermedad avance a la fase bacterémica, con una infección más generalizada, que compromete el bazo, riñones y ganglios linfáticos distantes del sitio de la exposición, al iniciar en órganos genitales aparecen lesiones localizadas de las vesículas seminales, testículos, cola del epidídimo y con menor frecuencia en cabeza del epidídimo. Durante la fase bacterémica los microorganismos se localizan en riñones, y en algunos carneros hay excreción de B. ovis por vías urinarias. Esta bacteremia provoca nefritis intersticial crónica en los ovinos, cuando la infección progresa en las hembras las fases regional y bacterémica de la enfermedad son muy distintas como se menciona anteriormente (1,2).

Para el diagnóstico de la brucelosis se cuenta con las pruebas serológicas siguientes en las cuales nos podemos apoyar para el estudio de sueros obtenidos de animales a estudiarse.

PRUEBAS SERODIAGNOSTICAS PARA DETECCION DE ANTICUERPOS DE BRUCELLA.

Prueba de Rosa de Bengala.

Prueba de la tarjeta.

Prueba de analisis inmunoenzimatico (ELISA).

Prueba de la antiglobulina de Commbs.

Prueba de fijación de complemento.

Prueba de aglutinación estándar en tubo.

Prueba de 2 mercaptoetanol.

Prueba de aglutinación estándar en tubo modificada por el
acido etilendiaminotetraacético (EDTA).

PRUEBA DE ROSA DE BENGALA.

Algunas investigaciones han sido conducidas a establecer la efectividad de esta prueba en borregos, pero existe dísCORDANCIA que puede ser explicada por la diferente sensibilidad del ántige no empleado, esta prueba parece detectar tempranamente la infección y más rápido que la prueba Fijación de Complemento, la prueba de Rosa de Bengala parece también eliminar los bajos títulos de la prueba de Aglutinación Estándar en tubo y en muchos casos los falsos positivos. (10, 41)

PRUEBA DE LA TARJETA:

Prueba serodiagnostica utilizada en forma rutinaria con la ventaja de obtener rápidamente los resultados después de 4 minutos se invalida la aglutinación en placa, al utilizar el mismo antígeno para la prueba de la tarjeta B. abortus 1119-3 teñido con Rosa de Bengala.

Es importante señalar que la prueba de Rosa de Bengala su pH de 7.0 es neutro a diferencia de la prueba de la tarjeta que tiene un pH ácido de 3.55 ± 0.05 teñido con Rosa de Bengala. (30,41)

PRUEBA DE ANALISIS INMUNOENZIMATICO (ELISA).

Esta se encuentra en etapa de valoración para su aplicación en el diagnóstico de la brucelosis en pequeños rumiantes (7,20,28,34,38).

PRUEBA DE LA ANTIGLOBULINA DE COMMBS:

Esta es usada en sueros controles de animales que dieron resultados negativos, sospechosos ó con respuesta incompleta a la prueba de aglutinación estándar en tubo, debido a la presencia de anticuerpos en el suero y demuestra una sensibilidad para ambos anticuerpos, IgG 1 y, IgG 2 (14, 39).

PRUEBA DE FIJACION DE COMPLEMENTO :

Esta considerada como el método más sensible y específico para el diagnóstico de la brucelosis.

La prueba fijación de complemento puede dar reacción negativa en infecciones tempranas, pero es particularmente de gran valor en la detección de infecciones crónicas y en la diferenciación de las reacciones serológicas entre animales vacunados con la cepa Rev. I, de los infectados de manera natural(3,15, 39).

PRUEBA AGLUTINACION ESTANDAR EN TUBO:

Es ampliamente usada en ovinos, los sueros se diluyen en una solución hipertónica de NaCl al 5% necesaria para evitar el fenómeno de zona. Esto es debido a, las altas concentraciones de inmunoglobulinas IgG1 no aglutinables que actúan como bloqueadores de anticuerpos, son capaces de prevenir la fijación de IgG2 al antígeno de superficie (14).

Este método presenta muchas limitantes siendo las más importantes de estas, que da resultados que pueden ser negativos o sospechosos de infecciones crónicas, estos inconvenientes han sido demostrados en ovinos (22,31,32,36), por estas razones la prueba de aglutinación estándar en tubo puede ser usada solamente en preselección.

PRUEBA DE 2 MERCAPTOETANOL:

El 2 mercaptoetanol inactiva las inmunoglobulinas IgM presentes en el suero. Además esta prueba nos sirve para detectar las inmunoglobulinas IgG por esta peculiaridad un número bajo de falsos positivos, que los obtenidos en la prueba de Rosa de Bengala. Este método puede detectar animales con infección crónica y puede reducir pero no eliminar positivos debido a , antígenos heterólogos (9, 26).

PRUEBA DE AGLUTINACION ESTANDAR EN TUBO MODIFICADA POR EL
ACIDO ETILENDIAMINOTETRAACETICO (EDTA).

La actividad de aglutinación de Brucella en el suero de una elevada proporción de animales no infectados, que reaccionan a la prueba de aglutinación estándar en tubo, es inestable en presencia de la sal sódica del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) un agente quelante. Estas aglutininas llamadas EDTA-labiles se asocian 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 Fab. Por lo que esta interacción es bloqueada por el EDTA (2,12,17,23,27).

ANTECEDENTES:

El agente etiológico de la brucelosis en humanos fué descubierto por Bruce en el bazo de personas muertas por esa infección logrando aislar el germen en 1886 (4).

En la guerra de Crimea 1854-1856, se observaron numerosos casos de fiebres prolongadas no comparables con otras enfermedades conocidas hasta entonces en el Mediterráneo y la Isla de Malta en 1751, Clerghorn presentó las primeras descripciones. En el año de 1845 Marson describió detalladamente la enfermedad ocurrida en Malta. En 1887, Wright y Semple (40) desarrollaron un estudio de diagnóstico como base aglutinante de suero sanguíneo en enfermos (41), en 1867 Huges presentó monografía más completa sobre la materia (40).

El Dr. Zammit (41) en 1905 encontró aglutininas en suero de cabras, Dr. Hurcks descubrió B. melitensis en la leche y en la orina de las cabras infectadas, esto originó la prohibición del consumo de leche en la Isla de Malta. En 1904 las cifras de morbilidad fueron de 6 a 7 por cada 100 habitantes. Según Gat (18) entre 1936 y 1937 se reportaron 12,780 casos y en 1934, 684 defunciones. En 1897 presentaron un trabajo sobre etiología de aborto contagioso y el agente etiológico lo llamarón bacilo de Bang.

En 1969 Rodriguez Heres, (35) muestreo 160 vacas con antecedentes de aborto contagioso y encontró el 32.7% de reaccionantes a brucelosis y 16.% de leptospirosis, por esto concluyó que las infecciones podrian ser responsables en la zona estudiada (35).

En 1970, situaron por algunas estimaciones la prevalencia de la brucelosis en el país en un 4% con valores mínimos y en

maximos de 0.20 y 20.5 %. hubo notable disminuci3n de 1970 a 1971 debido a la campaa de vacunaci3n, aunque en muchas zonas existi3o prevalencia superior al 5%, solo en el estado de Chihuahua y en el estado de Hidalgo se tuvieron prevalencias del 1% (23). En 1976 Scheibner demostr3 que se puede eliminar virtualmente en las reacciones de aglutinaci3n no especifica de B. abortus muy altas que constituyen un problema al diagn3stico, adicionando una sal sodica, (27).

Nielsen y Col en 1979, describen una prueba en la que el antígeno de Brucella utilizado en la prueba de aglutinaci3n estandar en tubo modificada por la adici3n de E.D.T.A., y demostraron que en 18 sueros de bovinos bacteriol3gicamente confirmados positivos, sus titulos finales no fueron afectados por la adici3n del E.D.T.A., (26). 56

En 1979, se report3 el primer brote de epididimitis ovina en M3xico originado por B. ovis, al importar 13 sementales de la raza Suffolk e introducirlos a un rebaa3o de Guanajuato, estos presentaban lesiones macro y microscopicas caracteristicas de la infecci3n causada por B. ovis, por primera vez se aisl3 B. ovis en el pa3s, (29).

En un muestreo serol3gico realizado en Mexical3, Tecate, y, Tijuana en 1981, revel3 6.22% de prevalencia en 1934 vacas examinadas. Se considero que para 1982 la brucelosis habia disminuido en un 2% en ganado de carne y en un 4% en ganado lechero (36). En 1985 Mac Milan y Col trabajaron muestras de suero de bovinos infectados con B. abortus colectados durante el programa de Control y Erradicaci3n de la brucelosis en Gran Bretaa, al

trabajar los sueros con la prueba de aglutinación estándar en tubo modificada con E.D.T.A., observaron que disminuían los títulos (23).

También en 1985 Nowlan y de Geus, demostraron que las reacciones de aglutinación en el suero de bovinos infectados con la cepa 544 y vacunados disminuían los títulos con la técnica aglutinación estándar en tubo modificada con E.D.T.A., y , que de 32 animales ningún suero sanguíneo se vió alterada la reacción de aglutinación debido a B.abortus (27). También lo reportaron Garin y Col en 1985 (17).

En 1988, De Gaus y Nowlan reportaron que durante la campaña de Erradicación de brucelosis realizada en Irlanda de 1985 a 1986 se muestrearon 3,164,222 bovinos hembras, de los cuales dieron reacción positiva 5,104 trabajados con la técnica de aglutinación lenta en tubo, solo 852 el 17% del total de positivos (0.036% de los rebaños nacionales) por la técnica de aglutinación lenta en tubo modificada con E.D.T.A. (12).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

En virtud de los pocos trabajos encaminados a conocer la sensibilidad y especificidad de los antígenos utilizados para el diagnóstico de la Brucella ovis y considerando que la SARH estima que la población ovina en México se encuentra infectada en un 80% (comunicación personal del Delegado Estatal Ing. Rene Alejandro Orozco Santoyo), es necesario desarrollar trabajos serológicos para el diagnóstico eficaz y demostrar la frecuencia de esta enfermedad.

JUSTIFICACION:

Es imprescindible contar con un método de diagnóstico de esta zoonosis, ya que desgraciadamente no se puede diagnosticar por signología clínica y por los métodos serológicos tradicionales.

HIPOTESIS:

Con el empleo de diferentes técnicas serológicas y antígeno específico correlacionado con los cultivos microbiológicos es posible diagnosticar Brucella ovis.

OBJETIVOS GENERALES:

Detección de anticuerpos y aislamiento microbiológico de Brucella ovis en ovinos hembras sacrificados en el Rastro Municipal de Guadalajara

OBJETIVOS PARTICULARES:

Evaluar el antígeno de Brucella canis RM 6/66 en las pruebas serológicas aglutinación lenta en tubo, 2 mercaptoetanol y aglutinación lenta en tubo con EDTA.

Detectar anticuerpos contra Brucella ovis empleando antígeno Brucella abortus 1119-3, mediante las técnicas serológicas prueba de la tarjeta, aglutinación lenta en tubo con EDTA.

Correlacionar la titulación serológica de las diferentes pruebas entre sí. con los antígenos utilizados,

MATERIAL Y METODOS:

Se recolectaron 116 muestras de suero sanguíneo y de secreción vaginal de ovinos hembras sacrificados en el Rastro Municipal de Guadalajara, procedentes del estado de Colima, y de Jalisco de los municipios de Tlájómulco de Zúñiga, Tala, Tapalpa y de la periferia de Guadalajara de crias de traspatio principalmente.

Las muestras fueron trabajadas 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.

Recolección de muestra de sangre:

Se desinfectó la piel con alcohol yodado al 10%, se usó jeringa estéril, se tomo una muestra de 10 ml de sangre por punción en la vena yugular. Se deposito en tubo de ensaye, se transportó con refrigerante en termo manteniendose la temperatura de 4°C para su remisión al laboratorio de bacteriología del Area de Medicina y Salud Pública de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, se centrifugó las muestras sanguineas a 2,000 r.p.m. por 5 minutos con la finalidad se separar el suero del paquete eritrocitico, este se utilizó para la determinación de aglutitininas contra Brucella.

Los antígenos usados en las pruebas serológicas de aglutinación estándar en tubo, 2 mercaptoetanol y estándar en tubo en presencia del ácido etilendiaminotetraácético (EDTA), fué una suspensión de Brucella abortus cepa 1119-3 de la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE), para la detección de anticuerpos contra las cepas lisas y el antígeno Brucella canis cepa RM 6/66 para las cepas rugosas.

Aglutinación estándar en tubo:

El procedimiento fué de acuerdo al método descrito por Alton Y López Merino (1,2,4), se emplearon diferentes diluciones de suero en solución salina al 5% Y fenol al 0.5% como diluyente, en una serie de tubos (13x100mm) iniciando por una solución 1:20 y finalizando con 1:320. Se añadió volumen igual (0.5ml) de una solución 1:100 de la suspensión original del antígeno de Brucella abortus cepa 1119-3, los tubos se agitaron vigorosamente se incubaron a 37°C por 48 horas, se efectuó la lectura sin agitar los tubos en cada prueba se incluyó un suero control positivo.

Para la detección de anticuerpos contra células rugosas se preparo una solución A y una solución B.

Solución A - (solución formalizada).

10 ml de formaldehido.

90 ml de NaCl al 85%.

Solución B -

NaCl al 35% p/v.

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.

Dilución del antígeno:

Se agregaron 0.6 ml de la solución formalizada en 99.4 ml de la solución B y 4.4 ml del antígeno de Brucella canis cepa RM 6/66 en 65.5 ml de la solución diluyente (1,3,4,5).

Aglutinación lenta en tubo en presencia de 2 mercaptoetanol:

El desarrollo del método se efectuó 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 molar.
- = El antígeno se diluyó 1:100 para las cepas lisas y para las rugosas fué de acuerdo al procedimiento anterior. La incubación y lectura se efectuaron de la misma ya descrita (1,3,4,5).

Aglutinación estándar en tubo adicionado con EDTA.

Se realizó de acuerdo a la prueba normal de aglutinación lenta en tubo, se empleo un diluyente constituido por una sal sódica (ácido etilendiaminotetaácético), en una proporción de 10 mm/lt. de solución tamponada con fosfatos a un pH de 7.2 en lugar de solución salina fenolizada las condiciones de incubación y lectura son las mismas descritas en los procedimientos anteriores para las células lisas como para las células rugosas (12, 23). Se determinó la aglutinación por una capa de células depositadas en el fondo y la clarificación del sobrenadante. La aglutinación negativa se determinó al no observarse clarificación del sobrenadante, aún cuando las bacterias se depositaron en el fondo del tubo formando un botón uniforme. (27).

Prueba de la tarjeta:

Se empleo el antígeno de Brucella 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 darse por negativa la prueba en ausencia de aglutinación.

Toma de muestras de secreción vaginal:

Se desinfectó los genitales externos con solución yodada al 10%, se usó un hisopo esteril para cada animal el cual se introdujo en la vagina y posteriormente se depositó en un medio de transporte (Farell), se colocó en un recipiente térmico con refrigerante para conservar la temperatura a 4°C se remitieron al laboratorio de Bacteriología del Departamento de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Guadalajara, para practicar los cultivos.

El cultivo microbiológico a partir de secreciones vaginales se realizó de la siguiente manera:

Se sembraron por duplicado en el medio de Farell (21), el cual contiene;

- Bacitracina (25 mg/ml).
- Polimixina B (5 mg/ml).
- Cicloeximida (100mg/ml).
- Vancomicina (20 mg/ml).
- Acido nalidíxico (5mg/ml).
- Nistatina (100mg/ml).

El medio base fué agar casoy (Merck) adicionado de glucosa al 1% y sangre de borrego al 5% exenta de aglutininas contra las especies de Brucella. Una placa se incubó a 37°C durante una semana en una atmósfera normal para el aislamiento de B. melitensis, B. suis, B. canis y B. abortus, la otra placa en presencia de CO₂ al 5% para evitar que no se pierda algunas especies bacterianas como B. abortus y B. ovis.

RESULTADOS:

Los resultados de los sueros estudiados con el antígeno B. canis RM 6/66 para cepas rugosas en las diferentes pruebas serológicas nos muestra que de un total de 116 sueros sanguíneos de ovinos hembras, 110 (95%) reaccionaron positivamente de una a más pruebas serodiagnostics utilizadas en una dilución de 1:40 de acuerdo como se reporta en el Manual de Normas y Procedimientos de la Campaña Nacional contra la brucelosis (ver cuadro 1).

Con la prueba lenta en tubo 110 (95%) fueron positivos, solo 21 (18%) a la prueba 2 mercaptoetanol y 74 (64%) a la prueba EDTA modificado.

El porcentaje de sueros positivos y sus titulaciones se muestran en el cuadro 2.

Cuando se usó el antígeno B. abortus 1119-3 para cepas lisas encontramos que de 116 sueros trabajados solo 4 (2%) reaccionaron positivamente a las pruebas Huddleson y aglutinación estándar en tubo con los titulos de 1:20 hasta 1:200 (ver cuadros 3 y 4).

Con respecto a los cultivos bacteriológicos de las secreciones vaginales, no fué posible aislar el agente etiológico.

Cuadro 1. Comparación de sueros positivos utilizando el antígeno B. canis 6/66.

		Tipos de prueba		
No. de sueros		Estándar en tubo	2 Mercaptoetanol	EDTA
Positivos	110	110	21	93
Negativos	06	06	95	23
Total	116	116	116	116

Cuadro 2 Relación de sueros positivos con antígeno B. canis RM 6/66.

Tipos de pruebas				
Título	No. de sueros	Estándar en tubo	2-Mercaptoetanol	EDTA
1:20	1	1	—	—
1:40	8	8	—	(1) 1:40 (1) 1:80 (1) 1:320
1:80	27	27	(1) 1:40 (1) 1:80	(1) 1:40 (1) 1:80 (1) 1:320
1:160	42	42	(6) 1:80 (7) 1:160	(10) 1:80 (15) 1:160 (13) 1:320
1:320	32	32	(2) 1:80 (2) 1:160 (2) 1:320	(5) 1:80 (8) 1:160 (17) 1:320
Totales	116	110	21	74

Cuadro 3 Total de sueros trabajados 116 con el antígeno B. abortus 1119-3

	Tipos de prueba				
	Estándar en tubo	2 Mercaptoetanol	E D T A	Tarjeta	Huddleson
Positivos 4 (3%)		—	—	—	2 (1%)
Negativos 112 (97%)		116	116	116	114

Cuadro 4 Comparación de sueros positivos utilizando antígeno B. abortus 1119-3

Tipos de pruebas		
Estándar en tubo	2 Mercaptoetanol	E D T A
2 (1:20) *	—	—
—	—	—
—	—	—
2 (1:200) *	—	—
—	—	—

* Título.

DISCUSION:

En el presente estudio se trabajaron 116 sueros sanguíneos, detectandose el 2% de seropositividad para cepas lisas con el antígeno B. abortus 1119-3 y un 95% cuando se empleo el antígeno B. canis RM 6/66 para cepas rugosas, tomandose como positivas la titulación de 1:40 de acuerdo como lo marca el Manual de Normas y Procedimientos de la Campaña Nacional contra la Brucecelosis, de la Dirección General de Fomento y Protección Pecuaria S.A.R.H.

Martínez Herrera(1988), realizó un estudio similar para determinar la titulación de anticuerpos contra B. melitensis en cabras con problemas de infertilidad y aborto, utilizó al antígeno B. abortus 1119-3 para cepas lisas, que obtuvo 11.2% de sueros positivos, además trabajó con los antígenos rugosos B. abortus -- 45/20 y B. melitensis B115, que le resultó el 21.8% y el 10% de sueros positivos respectivamente. De acuerdo a los resultados en ambos trabajos se infiere que las cepas rugosas son altamente inmunogénicas .

Resulta importante señalar la gran sensibilidad y especificidad que mostró el antígeno de B. canis RM 6/66 en los sueros de ovinos, como lo demostraron FLORES-CASTRO Y CARMICHAEL (1986) que reportaron fuertes reacciones de aglutinación con antisueros específicos contra B. ovis, pero no con antisueros para las cepas lisas B. abortus, B. melitensis y B. suis.

Con respecto a la prueba de aglutinación estándar en tubo para las cepas lisas, hubo un 2% de sueros positivos, en compa-

ración con la prueba de aglutinación estándar en tubo con EDTA que no presentó títulos; pero en cambio cuando se empleo el antígeno rugoso el 95% que reaccionó positivamente a la prueba de -- aglutinación estándar en tubo disminuyó en un 64% cuando se trabajó para la prueba de aglutinación estándar en tubo con EDTA, -- resultados similares han sido reportados por NIELSEN(1979), GARIN (1985), MAC MILLAN (1985), NOWLAN (1985), y DE GEUS (1988), que utilizaron la prueba en bovinos. Por lo que se concluye, que el disminuir la titulación al utilizar en EDTA, se debe a la presencia en el suero de ambos anticuerpos: EDTA-labiles y de infección .

En cuanto a los resultados negativos de los cultivos bacteriológicos, se debe posiblemente a que la infección ocurrió cuando la borrega se encontró gestante, que bien pudo abortar o haber llegado al término de la gestación, pero si ocurriera la infección cuando la hembra no estuviera preñada, la bacteria se depositaría en el aparato genital y se estaría eliminando con regularidad como lo reporta el Comité Mixto de la FAO/OMS de expertos en Brucelosis (8).

CONCLUSIONES:

- 1) No se recomienda el uso de las técnicas: Prueba de la Tarjeta y la reacción de Huddleson para trabajar sueros de ovinos por la baja presencia de anticuerpos a cepas lisas.
- 2) Se recomienda al uso de las pruebas: Lenta en tubo, 2 mercaptoetanol siempre y cuando se tome en cuenta las reacciones por la presencia de los anticuerpos heterólogos y se utilice al antígeno rugoso.
- 3) El uso de la prueba lenta en tubo con EDTA es recomendable para eliminar los falsos positivos.
- 4) El porcentaje de anticuerpos en ovinos a cepas lisas en este estudio es de 4% y de cepas rugosas es de 95%.
- 5) No se logró al aislamiento de Brucella ovis a partir de secreciones vaginales de 116 hembras debido a la ausencia del agente etiológico por lo tanto no se pudo establecer la correlación con la titulación serológica.

BIBLIOGRAFIA:

- 1.- ALTON, G. L.M. JONES, and D.E. PIETZ.: Laboratory techniques in brucellosis. World Health Organization, Geneva. 1975.
- 2.- ALTON, G.G. E.T. AL.: Las técnicas de laboratorio en la brucelosis, 2a. ed. Ginebra, Organización Mundial de la Salud - (O.M.S. serie de monógrafias, No. 55). 1975.
- 3.- ALTON, G.G. L.M. and PIETZ, D.E.: La brucellose techniques techniques for de laboratoire. 2me ed., O.M.S. Geneve. 1977.
- 4.- ALTON, G.G.: The epidemiology of Brucella melitensis a seminar in sheep and goats. The cec programe co-ordiantion of resear on animal pathology, held in Brusseis at the cimission of the European communities, 14-15 november. 1984.
- 5.- ALTON. G.G., L.M. JONES. R.D. ANGUS and J.M. VERGER.: Techniques for the brucellosis laboratory INRA Paris. (ed) 1988.
- 6.- CAROFF, MARTINE., DAVID R. BUNDIE, MAICOL, B. PERRY. JHON W. CHERWONOGRODZKY and J. ROBERT DUNCAN.: Antigenic s-type lipopolysaccharde of Brucella abortus 1119-3. 1984.
- 7.- CHIN. J,C.: Comparison of different antigenic preparation for the detection of ovine serun antibodies against Brucella ovis by Elisa. Vet. J., 60 261-264 Austr.(1983).
- 8.- COMITE MIXTO DE LA FAO/OMS DE EXPERTOS EN BRUCELOSIS.: Sexto informe. 1986.
- 9.- CORBEL, M.J.: The nature of the antibody response to yersinia enterocolica serotype in acte, J. Hyg. Cambi., 71. 309-323. (1973)

- 10.- CORBEL, J.M. K.M.W. GILL and D.W. REWOOD.: Diagnosis procedures for non-smooth Brucella strains, Ministry of agriculture, fisheries and food. Central laboratory New Haw, - Weybridge, England. 1979.
- 11.- CORBEL, M.J.K. D.W. GILL and E.L. THOMAS.: Methods for the identification of Brucella booklet 2085. Central veterinary laboratory U.K. New Haw. Weybridge. 1983.
- 12.- DE GEUS, H., D.F. NOWLAN.: Identification of run-specific agglutination of Brucella abortus using an EDTA modified test. Vet. Rec. 123:184. (1988).
- 13.- DEL RIO. J.A.: Campaña contra la brucelosis en México, antecedentes y estrategias, Foro nacional sobre brucelosis, México D.F. 1978.
- 14.- DIAZ, R. and LEVEUX. D.: Role respectif en serologie globulines G 1 y G 2 dans les tests d'agglutination, le phenomene de zone, C.R. Acad. Sci., 274, 1595-1596. Paris. (1972).
- 15.- FARINA.: Current serological methods in br. melitensis diagnosis. Brucella melitensis a seminar in the cec programme of co-ordination of the european communities, 14-15 november 1984. Edited by J.M. VERGEL and M. PLOMMET. Institut national de la recherche agronomique. Nouzilly France. 1985.
- MARTINUS NYHOFF.: Publishers. A member of the european academic publishers group for the commission of the european communities Boston/Vanlaster. 1985.
- 16.- FLORES-CASTRO. R.y L. CARMICHEL.: Caracterización de las diferentes cepas de Brucella canis, Rv. Latamer. microbiol. 28: 145-151. (1986).
- 17.- GARIN, B. D. TRAP, R. GAUMANT.: Assessment of the EDTA seroagglutination test for the diagnosis of bovine brucellosis, - vet. rec., 117: 444-445. (1985).

- 18.- GATT. S.H.E.: Undalat fever in Malta. Brit. Med. Jor., 26: 454. (1938).
- 19.- HUERTA-PEÑA Y AIDE LOPEZ M.: Clasificación de las cepas de Brucella pertenecientes al laboratorio del Instituto Nacional de diagnóstico y referencia epidemiológicas. Rev. Lat. Amer. Microbiol 31: 195-198. (1989).
- 20.- HURVELL, B.: Serological cross-reaction between yersinia and Brucella and possibility of diferential diagnosi by the ELISA tecchenique and electroinmuossay. Nord. Vet. 30: 305-317. (1978).
- 21.- LOPEZ - MERINO. AHIDE.: Manual de técnicas y procedimientos para el estudio de la brucelosis. Instituto de Salubridad y enfermedades tropicales, Secretaria de Salud. (1987).
- 22.- LERCHE, M. and ENTHEL, H.J.: Der anchweis levender melitensis bakterien in egweven und organes Brucella-ansteck ungsver - dachtiger schaltschafe, tieraztl. Wschr., 27: 319-322. Berl. Munch. 1959.
- 23.- MAC. MILAN, A.P., D.S. COCHEN.: Reduction nun-specific reac tions to the Brucella abortus serun agglutination test by - the addition of EDTA. Res. Vet. Sc, 31: 288-291. (1985).
- 24.- Manual de normas y procedimientos de la campaña nacional con tra la brucelosis. Dirección general de fomento y protección pecuaria, Dirección de Sanidad Animal. México, D.F. (1989).
- 25.- MARTINEZ HERRERA, D.I.: Determinación de Anticuerpos contra Brucella abortus y Brucella melitensis en caprinos con pro blemas de Infertilidad y Aborto. Tesis de Licenciatura, Fa cultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México D.F. (1989).

- 26.- NIELSEN, K. B.S. SAMAGH, G.S. PEKAMN and B, STEMSHORN.: The bovine immune response to Brucella abortus. Elimination of a suma sporadic serological reaction by chelation of divalent cation. 1979.
- 27.- NOWLAN, P.F., H. de GEUS.: Use of EDTA. modified antigen in the serodiagnosis of bovine brucellosis. *Vet. Rec.* 116: 13. (1985).
- 28.- PELLERIN, J.L. GERAL, M.F. and LAUTI, R.: Le test immunoenzymatique ELISA dans le diagnostic serologique de la brucellose humaine. *Rev. Med. Vet.*, 131: 741-766. (1980).
- 29.- PEREZ, E., R.F. CASTRO, J.A. DE LA HIGAREDA, F.J. TRIGO, T.: Diagnóstico y descripción de un brote de epididimitis ovina en México originada por Brucella ovis. *Vet. Mex.* 10: 221-226 (1979)
- 30.- PIETZ, D,E, and SCHIIF, E.A.: A rapid Brucellosis card test using buffered Brucella antigenin (BBA), *Am. J. Vet. Res.* 29 (1968)
- 31.- RENOUX, and ALTON, G.: Etude sur la Brucella se ovine et caprine. IV réactions serologiques dans le lait de chèvres récemment infectés par Br. melitensis. *Art. Inst. Pasteur*, 32: 523-550. Tunis. (1955)
- 32.- RENOUX, G. ALTON, G, and MAHAFFEY, L.W.: Etude sur la Brucellose ovine et caprine. V reactions sérologiques le sang de brébis récemment infectées par Br. melitensis. *Art. Inst. Pasteur.* 33: 33-41. Tunis. (1956)
- 33.- RENOUX, G., PHILLIPPON, A, and PLOMMET, M.: Signification des faibles titres sérologiques pour le diagnostic de la brucellosis. Tunis. 1969. Symp. Series Immunobiol. stand. S. Karyer., 315-317. N.Y. (1970).

- 34.- RIS, D.R., HAMELL, K.L. and LONG, D.L. Comparison of an enzyme linked immunospecific assay (ELISA) with the cold complement fixation test for the serodiagnosis of Brucella ovis infections., vet. J., 32: 18-20. N.Z. (1984).
- 35.- RODRIGUEZ HERES, G.A.: Exploración serológica de la leptospirosis y brucelosis en ganado bovino y porcino con historia clínica de aborto, tésis de licenciatura, Escuela nacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México 1969.
- 36.- SALMAN, D. MEYER, M.E. HIRD, D.W.: Epidemiology of bovine brucellosis in the Mexicali Valley, data gathering results. Amer. J. Vet. Res. 45. México. (1984).
- 37.- SCHEIBNER, E.: Spezifitätsgrenzen der brucellose langsam-agglutinationsswchr. 89: 300-302. Berlin: Munch. Tierarztl. 1976.
- 38.- SPENCER, T.L. and BERGES, G.W.: Enzyme linked immunosorbent assay for Brucella ovis specific antibody in ram sera. res. Vet. J. 36: 194-198. (1984).
- 39.- UNEL, S. WILLIAMS, C.F. and SAATBIEFORA, A.W.: Realive value of the agglutination test complement fixation test and Combs (antiglobulin) test in the detection of Brucella melitensis infection in sheep. J. Comp. Path., 79: 155-159. (1969).
- 40.- WRIGHT, A.E. and SEMPLE, D.: on the employment of dead bacteria in the serum diagnosis of typhoid and Malta fever britch., Med. Jour., 1: 1214. (1887).
- 41.- ZAMMIT, T.: Preliminary note on the examination of the blood of goats suffering of Mediterranean fever. Rep. of Royal soc. commission of Mediterranean fever. (tomado de Huddleson) ref. 203. 1905.