

38
290



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

FALLA DE ORIGEN

DETECCION DE ANTICUERPOS CONTRA
BRUCELLA EN CAPRINOS UTILIZANDO
ANTIGENO POLY B.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A ;

EMMA DEL CARMEN SANTOS COY ROSAS





UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	10
MATERIALES Y EQUIPOS	11
METODOS	13
RESULTADOS	22
DISCUSION	29
CONCLUSIONES	33
BIBLIOGRAFIA	34

TITULO

DETECCION DE ANTICUERPOS CONTRA Brucella EN CAPRINOS UTILIZANDO ANTIGENO POLY B.

INTRODUCCION

La brucelosis en los pequeños ruminantes existe desde que estos animales se domesticaron; es una enfermedad que se encuentra distribuida en casi todo el mundo ya que el área afectada se extiende hacia el oeste a lo largo del litoral del Mar Mediterraneo y al este a través de Mongolia y norte de China. En Latinoamérica la enfermedad esta ausente en Canada y Estados Unidos, mientras que en México se presenta en una región territorial muy extensa en forma de triángulo cuya base esta formada por los estados de Chihuahua, Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas, y su vertice por porciones de los estados de Guanajuato, Queretaro, Michoacán, San Luis Potosí y Mexico. (Hitos y cols., 1982; Alton, 1987) Figura 1. La brucelosis en el ganado caprino es causada principalmente por Brucella melitensis de la cual se han tipificado tres biotipos. La enfermedad que esta especie produce tiene una gran importancia ya que su efecto sobre la economía pecuaria es muy alto en lo que se refiere a perdidas de crias y baja en la producción de leche principalmente. (Flores, 1986; Alton, 1987).

Aunque la B. melitensis afecta principalmente a borregos y cabras, esta se transmite facilmente al ganado vacuno en contacto con estas especies. Sin embargo, no se ha establecido si la infección puede mantenerse por si sola en el ganado vacuno en ausencia de estos pequeños ruminantes infectados. (Alton, 1987).

El principal signo de infección por B. melitensis es el aborto durante los últimos dos meses de gestación, es una infección pero no una enfermedad venérea. El mayor impacto en la comunidad resulta de la incidencia de enfermedad en humanos, que con frecuencia ocasiona infecciones de lenta evolución y un alto costo en el tratamiento efectivo con antibióticos. (Alton, 1987).

GENERALIDADES

Los microorganismos del genero Brucella son bacilos Gram negativos, inmóviles, no esporulados, de apariencia cocoide o cocobacilar, miden de 0.3 a 0.7 . Se encuentran en pares o en cadenas, pueden teñirse con el colorante Ziehl Nielsen modificado para Brucella ; son oxidasa positivos, reducen los nitratos y tienen un poder ureolitico variable (Burrows, 1981; Hites y cols., 1982). Para su crecimiento son indispensables las siguientes vitaminas: Tiamina, Niacina y Biotina, mientras que el Pantotenato de calcio tiene un efecto estimulante. Son gérmenes aerobios, aunque en algunos casos necesitan del 5 al 10 % de CO₂ para el aislamiento primario. Su rango de temperatura para el crecimiento va de 20 a 40 °C siendo la optima de 37 °C a un pH de 6.6 a 7.4 (W.H.O., 1971). Las especies del genero Brucella se pueden diferenciar por su sensibilidad a diversos colorantes (Comite Mixto FAO/CMS, 1970; Jawest, 1979; Hausler y cols., 1985). Cuadro 1.

Las colonias de Brucella aisladas a partir de tejidos son de tipo liso, pequeñas, redondas, convexas y translúcidas. Las bacterias de dicho genero se disocian con bastante facilidad a la forma rugosa, con consecuencia de una disminucion de la virulencia. (Flores, 1978; Burrows, 1981).

La vía de entrada mas común es oral, aunque se senala tambien la vía conjuntival y nasal, mediante aerosoles. En un animal gestante, la transmision del microorganismo al feto ocurre por vía uterina o bien por leche durante la lactancia. (Flores, 1986).

Una vez que la Brucella ha penetrado al organismo, los fagocitos (polimorfonucleares, neutrofilos y mononucleares) inician su papel de ingestión de estos, pretendiendo eliminar la infeccion. Pero, debido a la capacidad que tienen estas bacterias de multiplicarse en el interior de los fagocitos, logran destruirlos. En los ganglios linfáticos se produce una respuesta inmunológica, de ahí que la infeccion llegue a propiciar bacteremia, localizandose la bacteria en sitios como bazo, higado, médula ósea, ganglios linfáticos, glándula mamaria, útero y tejidos fetales a traves de las membranas corionicas (Anderson, 1986; Flores, 1986).

Las bruceas estimulan los dos tipos de respuesta inmune, humoral y celular. La respuesta inmune humoral es muy fuerte, ya que desencadena la formación de anticuerpos circulantes muy elevados, con lo que respecta a inmunoglobulinas IgM e IgG (Sutherland, 1980; Cortes, 1957). La respuesta inmune celular esta basada fundamentalmente en la actividad de linfocitos T y macrófagos.

La eliminación del microorganismo en animales infectados, se hace a través de leche, orina y principalmente secreciones vaginales, lo que propicia una gran diseminación de este, sobre todo después de ocurrido un aborto o parto ya que los fetos y envolturas son productos altamente contaminados (W.H.O., 1971; Anderson y cols., 1986; Flores, 1986).

Sin lugar a dudas uno de los aspectos de mayor relevancia al estudiar este género bacteriano, lo constituye el posible diagnóstico inmunológico, empleando técnicas de obtención de antígenos e instrumentando pruebas rápidas y confiables para su diagnóstico y estudio, de tal suerte que se ha visto que las cepas lisas de Brucella tienen en su superficie dos componentes de diferente movilidad catódica (Díaz y cols., 1979; Fernández y cols., 1982). El principal ha sido identificado como lipopolisacárido o S-LPS (Moreno y cols. 1979; Fernández y cols., 1982) el cual acarrea los antígenos A y M, y exhibe una variedad de actividades biológicas. Además presenta una reacción cruzada con Yersinia enterocolitica serotipo 09 (Alton y cols., 1975; Brinley y cols., 1979; Fernández y cols., 1982).

El otro componente se distingue por su alta difusibilidad en inmunoelectroforesis y pruebas de inmunodifusión, se le conoce como hapteno nativo (NH); es un polisacárido que carece completamente de cualquier semejanza relacionada con el lipopolisacárido de cepas lisas (S-LPS); no presenta actividad endotóxica y tiene un alto contenido de carbohidratos (Leong y cols., 1970; Jones y cols., 1980), se le ha designado como segundo polisacárido, polisacárido B, Poly B o PB (Díaz y cols., 1979; Moreno y cols., 1981; Fernández y cols., 1982).

Díaz y cols., (1968), concluyeron que este polisacárido o Poly B, se encuentra presente en la superficie celular de las cepas lisas de Brucella y solo en el citoplasma de las cepa rugosa de Brucella melitensis S-115 la cual carece de S-LPS (Jones y cols., 1980; Fernández y cols., 1982).

En la actualidad se han implementado técnicas de extracción y purificación de estos componentes, entre las que se tienen la extracción con fenol-agua, eter-agua y con ácido tricloroacético (Díaz y cols., 1979; Moreno y cols., 1981; Fernández y cols., 1982). Se ha demostrado que la fracción 5 de la extracción con fenol-agua contiene el PB y el S-LPS de Yersinia enterocolitica serotipo 09, por lo que en inmunodifusión presenta una identidad parcial. En geles de inmunodifusión añadidos de NaCl al 10% se presenta un segundo componente que da reacción de identidad con el Poly B de Brucella spp. No se conoce bien el porque de los requerimientos de NaCl, pero se ha visto que las inmunoglobulinas IgG1 reaccionan mejor con el antígeno en un medio hipertónico (Fernández y cols., 1982).

El estudio de las características que presenta el S-LPS y Poly B han permitido perfeccionar las técnicas serológicas para el diagnóstico de la brucelosis tanto humana como animal (cuadro 2), tal es el caso de la técnica de Inmuno Difusión Radial (RID) en la cual el antígeno Poly B es incorporado en el gel de agarosa que contiene un 10 % de Cloruro de Sodio, y el suero se añade a los pozos en el gel (Jones y cols., 1980); esta técnica ha sido desarrollada para diferenciar ganado vacuno infectado del ganado vacuno vacunado ya que el antígeno de Poly B preparado de la cepa rugosa de B. melitensis 16M así como de B. melitensis B-115 precipita con el suero del ganado infectado pero no con el suero de ganado vacunado con la cepa de B. abortus 19 (Domenico y cols., 1976; Jones y cols., 1980; Blasco y cols., 1982). No obstante este perfeccionamiento de los métodos empleados en el diagnóstico, el más seguro sigue siendo el aislamiento del agente etiológico, lo cual puede efectuarse de exudado vaginal y/o leche de hembras que han abortado. También se recomienda el cultivo a partir de placentas y membranas fetales, especialmente de contenido estomacal del feto, (Alton y cols., 1975; Flores, 1986).

Dentro de las pruebas serológicas a las cuales se puede recurrir (cuadro 2) y que con mayor frecuencia y confiabilidad se emplea es la de Fijación de Complemento; (Waghela y cols., 1980) esta prueba es altamente específica y más sensible que otras, su principal ventaja es la de poder identificar animales negativos aun transcurridos seis meses después de la vacuna Rev-1; los títulos de 1:10 de sueros de ovinos y caprinos por esta técnica se registraran como sospechosos mientras que los títulos de 1:20 o más serán positivos (Waghela, 1976; Diaz y cols., 1979; Del Rio y cols., 1984; Flores, 1986).

A pesar de ser una prueba exacta y la de mayor uso, han sido evidentes varios inconvenientes: primero, esta prueba no diferencia animales infectados de animales recientemente vacunados; segundo, dicha prueba esta sujeta a reacciones anticomplementarias y de prozona, las cuales ocurren como un resultado de bloqueo de las inmunoglobulinas IgG2 hacia las inmunoglobulinas del tipo IgG1 e IgM; tercero, la prueba por si misma esta supeditada a una gran variabilidad en resultados, dependiendo de diferencias menores en la técnica; cuarto, falla en identificar al animal con infección latente lo que causa una recrudescencia de la brucelosis en zonas que se creían libres de esta enfermedad (Sutherland, 1980). Sin embargo, existen perspectivas de control y prevención de la brucelosis en ovinos y caprinos como el desarrollo de vacunas tales como H-38 con adyuvante, S-19 y la vacuna viva atenuada de B. melitensis Rev-1, la cual es altamente inmunogénica y la más empleada en la actualidad para la prevención de la enfermedad en capras y borregos (Kolar, 1984), pues produce una inmunidad de aproximadamente cuatro y

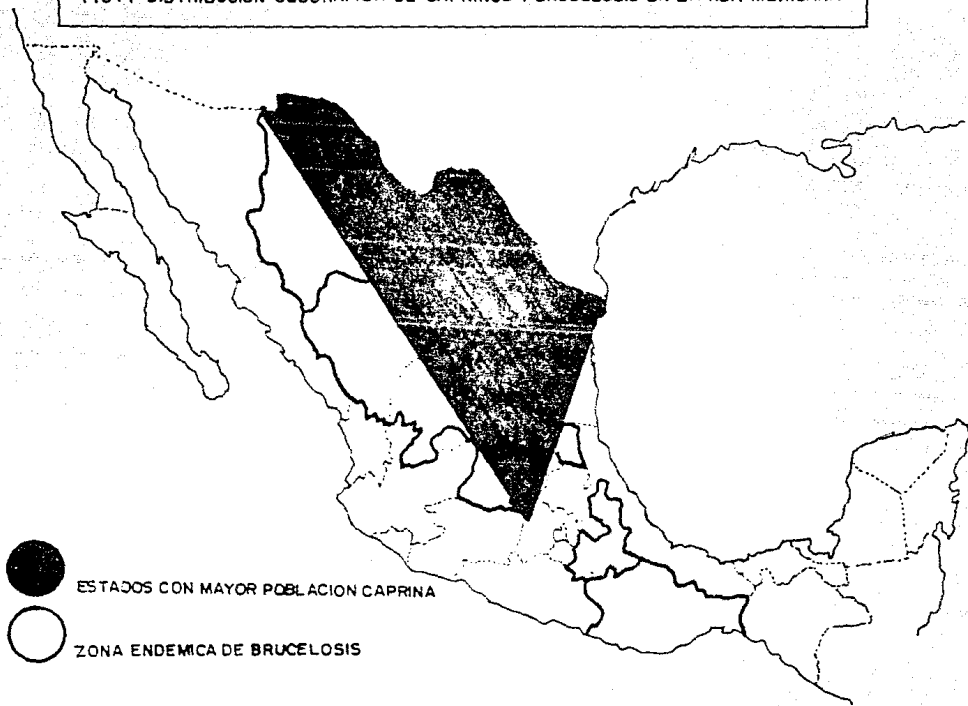
medio años (Brinley, 1970; FAO/OMS, 1970; Schuring, 1982). Las dosis de vacunación con Rev-1 en cabras son variables, las recomendaciones originales eran inocular animales jóvenes para reducir la persistencia de anticuerpos postvacunales y evitar así la vacunación de los adultos, particularmente aquellos que están preñados o son seropositivos. Se recomendaban dosis de 1 a 3×10^9 organismos vivos, aunque se ha visto que se obtiene protección similar con dosis de $1/100$ o $1/1000$ de la dosis original (Kolar, 1984). Alton (1970), encontró que a dosis de 5×10^4 células vivas en animales adultos, minimiza el riesgo de aborto y excreción causada por la vacuna; sin embargo, si recomienda una dosis mayor (7×10^8 o 3×10^9 células vivas) en animales jóvenes.

Las características principales de la vacuna Rev-1 según Alton (1978 y 1987) y Kolar (1984), se resumen de la siguiente manera:

- a) La vacuna Rev-1 es una vacuna viva atenuada y altamente inmunogénica preparada a partir de la cepa Rev-1 de B. melitensis.
- b) Las reacciones locales o generales después de la inoculación son pocas y las cabras preñadas podrían ocasionalmente abortar si se utiliza una dosis alta de vacuna por lo que no se recomienda una revacunación.
- c) Ocasionalmente se excretan los organismos de la vacuna en leche de cabras por un corto tiempo después de la vacunación.
- d) La cepa es segura y estable, no se incrementa su virulencia.
- e) La cepa de Rev-1 es patogénica para el hombre si se inocula parenteralmente.
- f) La vacunación induce la producción de anticuerpos y la sensibilización dérmica es de aproximadamente de 2 a 4 meses. En pocos casos, los anticuerpos pueden persistir más de 8 a 12 meses.
- g) La vacunación en rebaños infectados con Brucella, trae consigo una reducción significativa del número de abortos causados por brucelosis, y un decrecimiento del número de excreciones de microorganismos en leche o por vagina.
- h) En la rutina se recomiendan dosis de Rev-1 de 1×10^9 organismos viables en un volumen de 1 a 2 ml inyectados subcutáneamente.

i) La vacuna se recomienda a animales de 3 a 8 meses de edad.

FIG. 1 DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE CAPRINOS Y BRUCELOSIS EN LA REP. MEXICANA



CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES DE LAS ESPECIES Y BIOTIPOS DEL GÉNERO BRUCELLA

ESPECIES	BIO-TIPO	REQ. CO ₂	PROD. H ₂ S	UREASA	CRECIMIENTO EN:-				ERI-TRITOL 1mg/ml	PENICI-LINA 5 U.	AGLUTI-NACION CON SUE A M R	LISIS		RESERVORIO MAS COMUN	
					FUCSINA		TRONINA					FAGO ₄ TB 10	DHP		DHP
					BASICA	II III I	II III I	II III I							
<u>B. melitensis</u>	1	-	-	v	-	-	-	-	-	-	-	-	-	OVEJA, CABRA	
	2	-	-	v	+	+	+	+	-	-	-	-	-	OVEJA, CABRA	
	3	-	-	v	+	+	+	+	+	-	+	-	-	OVEJA, CABRA	
<u>B. abortus</u>	1	-	-	1-2H	+	+	+	+	-	-	-	-	+	BOVINO	
	2	-	-	1-2H	-	-	-	-	±	-	-	-	+	BOVINO	
	3	-	-	1-2H	+	+	+	+	-	-	-	-	+	BOVINO	
	4	-	-	1-2H	+	-	-	-	+	-	-	-	-	BOVINO	
	5	-	-	1-2H	+	+	+	+	+	+	-	-	+	BOVINO	
	6	-	-	1-2H	+	+	+	+	+	-	-	-	-	BOVINO	
	7	-	-	1-2H	+	+	+	+	+	+	-	-	-	BOVINO	
	9	-	-	1-2H	+	+	+	+	+	-	-	-	-	BOVINO	
	Cepa 10	-	-	1-2H	+	+	+	+	+	-	-	-	-	VACUNO	
<u>B. suis</u>	1	-	-	0-30'	-	-	+	+	+	-	-	-	-	CERDO	
	2	-	-	0-30'	-	-	+	+	-	-	-	-	-	CERDO, CABALLO.	
	3	-	-	0-30'	+	+	+	+	±	+	+	-	+	CERDO	
	4	-	-	0-30'	+	+	+	+	-	-	+	-	-	VENADO	
<u>B. canis</u>	-	-	0-30'	-	+	+	+	±	+	-	-	-	PERRO		
<u>B. ovis</u>	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	OVEJA		
<u>B. neotomae</u>	-	-	0-30'	-	+	+	+	-	-	+	-	-	RATA DEL DESIERTO.		

I-1:25,000 II-1:50,000 III- 1:100,000 (v)- 1:500,000 DHP- DOSIS HABITUAL DE PRUEBA

TOMADO DEL HAUSLER 1955.

CUADRO 2

PRUEBA SEROLOGICA	ABREVIACION	CARACTERISTICAS
Rosa de Bengala	RBPT	Prueba de aglutinación detecta Ac. IgM de manera mas eficaz.
Seroaglutinación	SAT	Detecta Ac. IgM, aunque se han fenómenos de prozona en muestras con título elevado
Anillo en leche	MRT	Identifica Ac. contra <u>Brucella</u> en la leche del tipo IgM, IgG IgA.
Fijación de Complemento	FC	prueba mas empleada en la actualidad, detecta Ac del tipo IgG1 mas efectivamente que los del tipo IgM
Intradérmica	IDT	mide el efecto de hipersensibilidad cutánea, y alcanza un máximo de intensidad despues de 24-48 hrs.

OBJETIVOS

- 1.- Probar dos metodos distintos de extracción para el antígeno Poly B, con dos cepas de Brucella melitensis y una cepa de Brucella abortus, con el fin de seleccionar aquella en la cual se obtenga mayor rendimiento y especificidad para la prueba de Doble Difusion.
- 2.- Correlacionar las técnicas de Tarjeta abortus, Tarjeta melitensis y Doble Difusion (utilizando antígeno de Poly B en esta ultima) con la técnica de Fijación de Complemento, para el diagnostico de brucelosis en caprinos.
- 3.- Determinar si es posible diferenciar animales vacunados de animales infectados mediante la técnica de Doble Difusion con el antígeno de Poly B.

MATERIALES Y EQUIPO

I.- REACTIVOS BIOLÓGICOS

Cepa de B. melitensis B-115, obtenida del cepario de SARH Tecamac, Edo. de Mex.

Cepa de B. melitensis 16M, obtenida del cepario de SARH Tecamac, Edo. de Mex.

Cepa de B. abortus 99S, donada por la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN.

Antisueros A y M Weybridge Lab., de SARH Tecamac, Edo. de Mex.

Lipopolisacárido de B. abortus y Salmonella spp, donado por la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN.

Paquete celular de B. abortus cepa 1119-3 de Pronavive.

Paquete celular de B. melitensis 16M, donado por el laboratorio de Brucelosis del Instituto de Enfermedades Tropicales. S.S.A.

Hematies de carnero, obtenidos en los laboratorios de SARH Tecamac, Edo. de Mex.

Hemolisina, obtenida en los laboratorios de SARH Tecamac, Edo. de Mex.

Complemento de cobayo, obtenido en los laboratorios de SARH Tecamac, Edo. de Mex.

II.- REACTIVOS QUÍMICOS Y SOLUCIONES

Agar soya tripticasa

Agar papa con suero

Infusión cerebro-corazón (BHI)

Extracto de levadura

Agar de Bordent-Gengou

Agarosa

Cristal violeta

Cloruro de sodio

Etanol

Acido sulfurico Q.P.

Solucion salina fisiológica (S.S.F.)

Fenol
Agua destilada
Agua desionizada
Acido tricloroacetico 0.05M
Tris-salino pH 7.0
Estandar de glucoosa 0.1 mg/ml
Sulfato de cobre pentahidratado 0.5% en citrato de sodio
al 1%
Reactivo de Folin
Albumina bovina 0.5 mg/ml
Carbonato de sodio al 2% en hidroxido de sodio 0.1N

III.- CRISTALERIA

Cajas petri de 50 mm de diametro
Perlas de vidrio
Botellas Roux
Tubos con tapon de rosca 20 X 140
Tubos de vidrio 12 X 75
Placa de vidrio

IV.- EQUIPO

Estufa a 37 C con atmosfera de CO₂ Blue M
Agitador magnetico
Centrifuga refrigerada
Espectrofotometro Bausch and Lomb
Porta filtro millipore con membrana de 0.65
Tubo para dializar PM 3800
Pipeta automatica de 0.25

MÉTODOS

El número total de sueros estudiados fue de 369, de los cuales 73 fueron de animales vacunados y 296 de no vacunados. Los sueros provenían de los siguientes estados: San Luis Potosí, Coahuila y Chihuahua.

La historia clínica de los animales de San Luis Potosí y Coahuila, solo señala una alimentación con alfalfa, concentrado y cascarilla de algodón; sus signos clínicos fueron: disminución en la producción, aborto y emaciación. Con respecto a los animales de Chihuahua, solo señala que estos estaban mezclados con ganado vacuno, presentando también abortos y baja en la producción.

Los animales vacunados eran adultos, se implementó una revacunación y los problemas de aborto se presentaron 51 días después de la revacunación.

PURIFICACION DE BRUCELLA

Una ampollita de B. melitensis B-115 liofilizada se reconstituyó con 0.5 ml de S.S.F., se sembró en agar papa con suero y agar soya tripticaseína con 0.5% de extracto de levadura; se incubó 48 hrs a 37°C y en una atmósfera de 5 a 10% de CO₂; al término de la incubación se realizaron pruebas de pureza (frotis para Gram y bioquímica completa). Para la purificación de la B. melitensis 16M y B. abortus, se siguió el mismo procedimiento anterior, sembrando también en caldo BHI.

OBTENCION DE BIOMASA

Inocular con un cultivo de B. melitensis B-115 100 ml de caldo soya tripticaseína con 0.5% de extracto de levadura e incubar 48-72 hrs a 37°C; con este inoculo se estandarizó el contenido de bacterias de acuerdo al método nefelométrico considerando el tubo 10 como óptimo. De ahí se procedió a sembrar botellas Roux conteniendo agar soya tripticaseína con 0.5% de extracto de levadura mas cristal violeta 1:1000 000, a razón de 10 ml de cultivo por botella. Incubar a 37 C en atmósfera de 5 a 10% de CO₂. El crecimiento obtenido se cosecha con solución salina y con ayuda de perlas de vidrio. La masa celular se recupera por centrifugación a 8000 rpm por 30 min. a 4 C. La obtención de biomasa para B. melitensis 16M y B. abortus 99S se desarrolla de igual manera que la B. melitensis B-115.

OBTENCION DEL ANTIGENO POLY B

TECNICA TRIS-FENOL

Con 15 ml de S.S.F. se cosechan las células y se les anade 2 $\frac{1}{2}$ de fenol dejando reposar dos dias. Lavar con 5 volúmenes de tris-salino eliminando el sobrenadante y añadiendo al paquete celular buffer tris-salino para dejar reposar a 4 C por espacio de dos semanas.

Al cabo de este tiempo agitar 30 min. a 4 C y centrifugar a 8000 rpm/30min/4 C, eliminar el paquete celular y anadir 5 volúmenes de etanol frio al sobrenadante; refrigerar 24 hrs y centrifugar bajo las mismas condiciones anteriores para sedimentar el precipitado nebuloso blanco. El sobrenadante se elimina mientras el paquete celular se disuelve en buffer tris-salino sin fenol.

Dializar contra el mismo buffer y anadir despues un volumen igual de fenol al 95% agitando continuamente a temperatura ambiente por una hora; centrifugar bajo las mismas condiciones anteriores, eliminar el paquete celular y agregar a la fase acuosa cinco volúmenes de etanol. Guardar 24 hrs. a 4 C y centrifugar otra vez eliminando el sobrenadante mientras que el paquete celular se disuelve en 1 $\frac{1}{2}$ de S.S.F. y se dializa contra S.S.F. por 24hrs.

Centrifugar 1hr/8000 rpm/4 C para obtener el antígeno Poly B del sobrenadante y desechar lo demas. Ver diagrama de flujo.

EXTRACCION DE ANTIGENO POLY B TECNICA DEL ACIDO TRICLOROACETICO

Los microorganismos se cosechan con 15 ml de S.S.F.; son centrifugados a 8000 rpm, 30 min. a 4 C, el sobrenadante se desecha mientras que el paquete celular se lava 3 veces con NaCl 0.15M y es resuspendido a razon de 20 gr de celulas por 100 ml de agua desionizada adicionando un volumen igual al final de acido tricloroacetico 0.5M.

Todo se mantiene en refrigeracion con agitacion por 18 hrs.; centrifugando nuevamente bajo las mismas condiciones anteriores, eliminando el paquete celular y ajustando el pH del sobrenadante a 6.5 con NaOH al 1%. Anadir 5 volúmenes de etanol frio y mantener en refrigeracion por 24 hrs. Centrifugar bajo condiciones anteriores nuevamente, eliminar el sobrenadante, y el precipitado (Poly B), resuspenderlo en agua desionizada y dializar contra ella misma por 5 dias; filtrar atraves de un filtro millipore de 0.65. Determinar carbohidratos y proteinas. Ver diagrama de flujo.

DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS

METODO DE DUBOIS

FUNDAMENTO

Los azúcares simples, oligosacáridos, polisacáridos y sus derivados, incluyendo los metil éteres con grupos reductores libres o potencialmente libres, dan color anaranjado-amarillo cuando son tratados con fenol y ácido sulfúrico concentrado. La reacción es sensible y el color es estable. Por el uso de esta reacción con fenol-ácido sulfúrico, ha sido desarrollado un método para determinar submicrocantidades de azúcares y sustancias relacionadas. En conjunción con el método de cromatografía en papel por partición es útil para la determinación de la composición de polisacáridos y sus metil derivados.

CURVA TIPO DE GLUCOSA 0.1 mg/ml

tubo	ml de std.	conc. en mg/ml	H ₂ O dest. ml	fenol 5%	H ₂ SO ₄ ml
1	0.000	0.0	1.000	1	5
2	0.115	11.5	0.525	1	5
3	0.350	35.0	0.650	1	5
4	0.525	52.5	0.475	1	5
5	0.700	70.0	0.300	1	5
6	0.875	87.5	0.125	1	5
7	1.000	100.0	0.000	1	5

Método

Poner primero la muestra, después el fenol y homogeneizar, adicionar por último el ácido sulfúrico dejándolo gotear lentamente agitando el tubo. Dejar reposar 15 min. a temperatura ambiente. Leer en espectrofotómetro a 480 nm para pentosas y 488 nm para hexosas.

DETERMINACION DE PROTEINAS
METODO DE LOWRY

Fundamento

- a) Reacción del cobre en medio alcalino con la proteína
b) La reducción del reactivo de Folin (ácido fosfomolibdico-ácido fosfotungstico) por las proteínas tratadas con el cobre.

Preparación de reactivos

Reactivo A: Solución de Na₂CO₃ al 2% en NaOH 0.1N

Reactivo B: Solución de CuSO₄ 5H₂O al 0.5% en citrato de sodio al 1%

Reactivo C: Mezclar 1 ml del reactivo B en 50 ml del reactivo A

Reactivo D: Reactivo de Folin diluido 1:3 con agua destilada

Solución tipo de proteína: Solución de albumina bovina 0.5 mg/ml en solución A.

CURVA TIPO DE ALBUMINA 0.5 mg/ml

tubo	sol. tipo proteína (ml)	reactivoA (ml)	reactivoC (ml)	reactivoD (ml)
1	0.1	0.4	5.0	0.5
2	0.2	0.3	5.0	0.5
3	0.3	0.2	5.0	0.5
4	0.4	0.1	5.0	0.5
5	0.5	0.0	5.0	0.5
6	0.6	0.5	5.0	0.5

METODO

- Añadir hasta el reactivo C
- Guardar en obscuridad 15 min.
- Reposar 10 min., leer en espectrofotómetro a 660 nm

TITULACION DEL ANTIGENO

Cada uno de los antígenos de Poly B obtenido se titulo con dos sueros controles positivos y dos sueros controles negativos, en diluciones de 1:2, 1:4, 1:8, y 1:16, en gel para doble difusion, con el fin de determinar la concentración optima de antígeno Poly B.

PRUEBAS DE PUREZA AL ANTIGENO

Se corren pruebas de pureza con antisueros especificos anti-A y anti-M. Asimismo, se efectua una doble difusion entre los distintos antígenos obtenidos y lipopolisacaridos de B. abortus y Salmonella spp. para observar si los antígenos contienen el lipopolisacarido presente.

A partir de estas pruebas, se procedio a ensayar con los 369 sueros de cabras recolectados en distintos estados de la República Mexicana; estos se separaron por grupos de vacunados y no vacunados. Ademas se tomo como referencia para demostrar la presencia de anticuerpos circulantes, la prueba de Fijacion de Complemento.

PRUEBA DE FIJACION DE COMPLEMENTO

Esta prueba se desarrollo en los laboratorios de SARH, Tecamac, Edo. de Mex., en colaboracion con el Dr. Villa Sandoval y de acuerdo a la monografia "Las tecnicas de Laboratorio en la Brucelosis" por Alton y cols., 1976, siguiendo la tecnica de Fijacion de Complemento en caliente para microvolúmenes.

PRUEBAS DE TARJETA

PRUEBA DE TARJETA CON B. abortus.

Procedimiento: Agregar 0.25 de suero caprino y 0.25 de antígeno Rosa de Bengala de B. abortus cepa 111-3 a temperatura ambiente, sobre una placa de vidrio; mezclar en forma circular con aplicadores de madera durante 45 segundos para homogeneizarlo. Si hay aglutinación inmediatamente o durante los primeros tres minutos, se considerara como positivo dicho suero, si no aglutina se reporta como negativo.

PRUEBA DE TARJETA CON B. melitensis

Repetir el procedimiento anterior, utilizando antígeno de Rosa de Bengala de B. melitensis 16M donada por el laboratorio de Brucelosis del Instituto de Enfermedades Tropicales, S.S.A.

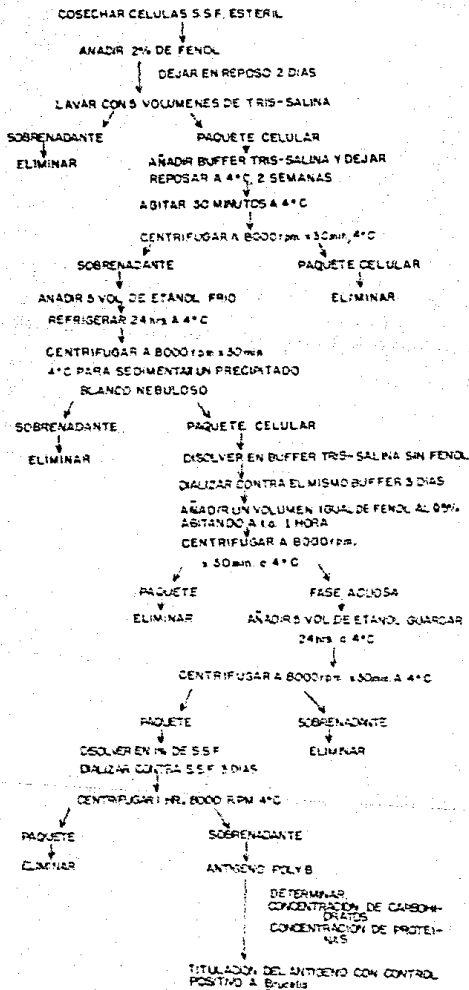
PRUEBA DE DOBLE DIFUSION (DD)

Disolver 10 gr de cloruro de sodio en 100 ml de buffer de glicina 0.1M pH 8.6 con esta solución se solubiliza la agarosa 0.9% con calor húmedo durante 10 min. a 5lb de presión.

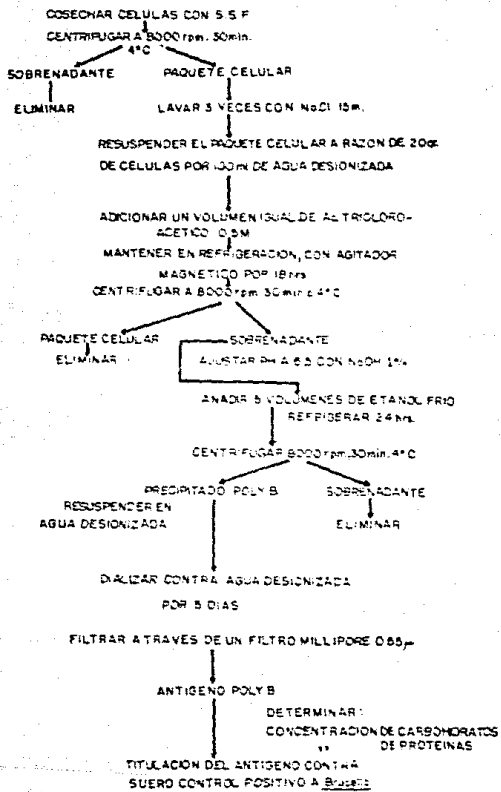
Vaciar 6 ml en cajas petri de 50 mm de diámetro, y una vez solidificado hacer pozos con ayuda de un patron, como lo muestra la fig.2. La distancia entre los pozos es de 1 cm.

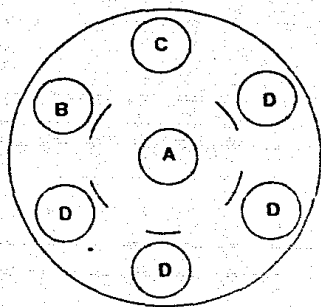
En el pozo central colocar 30 del antígeno Poly B en dilución óptima encontrada previamente en la titulación del mismo; en los pozos externos colocar también 30 de cada uno de los sueros problema, y sueros control positivo y negativo. Guardar las cajas en una cámara húmeda a temperatura ambiente y efectuar la lectura de la prueba (banda de precipitación) a las 4, 8, y 24 hrs.

OBTENCION DEL ANTIGENO POLY B
TECNICA TRIS-FENOL



EXTRACCIÓN DE ANTIGENO POLY B
 TÉCNICA DEL ÁCIDO TRICLOROACÉTICO





A: ANTIGENO POLY B
B: SUERO CONTROL +
C: SUERO CONTROL -
D: SUERO PROBLEMA

FIG.2 ESQUEMA DE DOBLE DIFUSION CON ANTIGENO POLY B

RESULTADOS

La biomasa obtenida para cada cepa de Brucella, en dos series de cultivos (llamados para efectos de distinción cultivo A y cultivo B) consecutivos, excepto Brucella abortus 99S fue:

		A	B
<u>B. melitensis</u>	B115	195 g.	60 g.
<u>B. melitensis</u>	16M	326 g.	5 g.
<u>B. abortus</u>	99S	137 g.	---

Las muestras de B. melitensis 16M y B. abortus probadas con los sueros monoespecificos anti-A y anti-M mostraron positividad al inicio de cada tecnica excepto B. melitensis B-115, una vez concluida la extraccion del antigeno Poly B ambas se manifestaron negativas.

El volumen y rendimiento de Poly B extraido de cada una de las muestras de Brucella y con las técnicas de tris-fenol y acido tricloroacetico (T.C.A.) se observa en los cuadros 3, 4 y 5. Asimismo la composicion quimica del antigeno Poly B en cuanto a contenido de carbohidratos y proteínas se reportan en el cuadro 6.

Cuadro 3

<u>Brucella</u>	Tecnica	
	Tris-fenol (ml)	T.C.A. (ml)
<u>melitensis</u> B-115	5.0	7.5
<u>melitensis</u> 16M	20.0	0.5
<u>abortus</u> 99S	4,5	--- *

* Esta prueba no se efectuo.

Cuadro 4

Rendimiento de Poly B (g) por cada 100 g. de biomasa humeda		
	tris-fenol	T.C.A.
B-115	0.546	0.5
16 M	2.6	2.0
99S	0.295	---

Cuadro 5

Rendimiento de Poly B en g por cada ml de solucion		
<u>Brucella</u>	tris-fenol	T.C.A.
B-115	0.213	0.04
16 M	0.425	0.20
99S	0.09	-----

Cuadro 6

Composicion quimica del Antigeno Poly B			
Antigeno Poly B	Concentracion Proteinas	Concentracion Carbohidratos	Relacion prot:chos
	g/ml		
B-115	.021	.355	1:16.90
16 M	.036	.680	1:18.89
abortus	.080	.545	1:6.81

En la titulación del antígeno Poly B, realizada con la técnica de doble difusión, se observó que la dilución óptima para efectuar esta prueba era de 1:4.

Dentro de las pruebas de pureza a los distintos antígenos de Poly B extraídos, se observó que todos ellos fueron negativos en lo referente al contenido de LFS para B. abortus y Salmonella spp. por el método de doble difusión, mientras que el control positivo mostró una banda de precipitación con estos antígenos, exceptuando para el antígeno extraído de B. melitensis B-115.

Se estudiaron un total de 369 sueros de cabras que procedían de animales vacunados (73) y no vacunados (296). Los resultados obtenidos en la prueba de fijación del Complemento fueron tomados como parámetro de comparación debido a que es la prueba reconocida, por la mayoría de los autores, como la que mejor correlaciona con infección en el animal.

Dentro de los animales vacunados, 44 dieron un título negativo, mientras que los 29 restantes fueron positivos a la prueba de fijación de complemento. Con la prueba de tarjeta abortus, realizada a estos animales se encontró que 30 mostraron positividad, al igual que en tarjeta melitensis; no así en doble difusión, donde se tuvieron 28 sueros positivos y 45 negativos como se puede observar en el cuadro 7.

Al respecto de los animales no vacunados, de un total de 296 sueros, se encontró que 229 fueron negativos y 67 presentaron títulos de positividad para la prueba de fijación de complemento. En tarjeta abortus se obtuvieron 179 sueros

negativos y 117 positivos y para tarjeta melitensis se encontraron 236 sueros negativos y 60 positivos (cuadro 8).

Cuadro 7

Resultados obtenidos en sueros de animales vacunados con las distintas pruebas serológicas empleadas.

VACUNADOS (73 ANIMALES)							
Fijación Complemento		Tarjeta abortus		Tarjeta melitensis		Doble Difusion con Poly B	
+	-	+	-	+	-	+	-
29	44	30	43	30	43	28	45

Cuadro 8

Resultados obtenidos en sueros de animales no vacunados con las distintas pruebas serológicas.

NO VACUNADOS (296 ANIMALES)							
Fijación Complemento		Tarjeta abortus		Tarjeta melitensis		Doble Difusion con Poly B	
+	-	+	-	+	-	+	-
67	229	117	179	60	236	63	233

Los cuadros 9 y 10 muestran los resultados obtenidos comparándolos con cada prueba en ambos bloques de animales. Con el fin de comprobar si las proporciones en los resultados son iguales y la compatibilidad de frecuencias observadas y

esperadas, se realizó el análisis estadístico con la prueba de X^2 (xi cuadrada) y la prueba de independencia mostrando una homogeneidad de frecuencias no significativas en los animales vacunados no así en los animales no vacunados. De tal forma que para mostrar la diferencia estadística entre las pruebas se efectuó un agrupamiento de los resultados obtenidos, en animales vacunados (cuadro 11) donde no se observó diferencia estadísticamente significativa. Por el contrario, cuando agrupamos los resultados de los animales no vacunados (cuadro 12) se presentaron diferencias estadísticamente significativas en especial con las pruebas de F.C. la cual detecta 26 sueros positivos mas que D.D. y T.A. que detecta 52 sueros positivos que en D.D. no se detectaron.

Cuadro 9

Comparacion de resultados por prueba				
VACUNADOS				
Fijacion Complemento	Tarjeta abortus	Tarjeta melitensis	Doble Difusion con Poly B	total sueros
+	+	+	+	24
+	+	+	-	1
+	+	-	-	4
-	+	+	+	1
-	-	+	+	3
-	-	+	-	1
-	-	-	-	39

Cuadro 10

Comparacion de resultados por prueba				
NO VACUNADOS				
Fijación Complemento	Tarjeta abortus	Tarjeta melitensis	Doble Difusion con Poly B	total sueros
+	+	+	+	39
+	+	+	-	1
+	+	-	-	25
+	+	-	+	4
-	+	+	-	5
-	+	-	-	21
-	+	-	+	5
-	-	-	-	196

Cuadro 11

Agrupación de resultados obtenidos mostrando diferencias entre las pruebas efectuadas	
<u>V A C U N A D O S</u>	
Fijación C'	5 positivas no detectadas por D.D.
Doble Difusión	4 positivas no detectadas por F.C.
Tarjeta Abortus	5 positivas no detectadas por D.D.
Doble Difusión	3 positivas no detectadas por T.A.
Tarjeta melitensis	2 positivas no detectadas por D.D.
Doble Difusión	0 pruebas no detectadas por T.M.

Cuadro 12

Agrupación de resultados obtenidos mostrando diferencias entre las pruebas efectuadas	
<u>N O V A C U N A D O S</u>	
Fijacion C'	26 positivas no detectadas por D.D.
Doble Difusión	5 positivas no detectadas por F.C.
Tarjeta abortus	52 positivas no detectadas por D.D.
Doble difusión	0 pruebas no detectadas por T.A.
Tarjeta Melitensis	6 positivas no detectadas por D.D.
Doble Difusion	4 positivas no detectadas por T.M.

DISCUSION

En el presente estudio observamos una marcada diferencia en la cantidad de biomasa obtenida entre los cultivos de una cepa, esto posiblemente debido a que el crecimiento fue lento en el medio de cultivo, lo que permitio que en algunos casos se desarrollaran otros microorganismos no deseados, ocasionando una variacion importante en la cosecha de biomasa. En el cultivo A de B. melitensis B-115 se obtuvieron 195 g de biomasa (paquete humedo), mientras que en el cultivo de B. melitensis 16 M se cosecho 326g de paquete; esto posiblemente fue debido a que el crecimiento de la cepa 16 M fue mas adecuado en el medio de cultivo utilizado y las condiciones empleadas.

La tecnica de tris fenol empleada para obtener el Poly B fue la informada por R. Diaz y cols. (1981) con ciertas modificaciones, y con la cual se obtuvieron resultados similares a los reportados por Leong y col. (1970), Moreno y col. (1979) y Diaz y col. (1981). Asimismo se extrajo el antigeno de Poly B con la tecnica de TCA descrita por R. Diaz y cols. (1979), Jones y cols. (1980), Fernández y cols. (1982), Cortes y cols. (1987). De acuerdo a Diaz y cols. (1979 y 1981), y con Jones y cols. (1980), se tiene un rendimiento del 0.4 a 0.5 % de Poly B por la tecnica de TCA para Brucella melitensis B-115, en tanto que Cortes M. (1987) reporta que a partir de 1 g de paquete celular humedo obtiene un promedio de 0.0747 g/ml de Poly B equivalente al mismo porcentaje reportado anteriormente y similar tambien al obtenido en este experimento con la misma cepa (0.0400 g/ml) (cuadro 5), Cortes M. (1987) reporta un rendimiento promedio para la cepa de B. melitensis 16M de 0.236 gr/ml mientras que el obtenido aqui, fue de 0.20 g/ml, un rendimiento igual por la diferencia tan pequena que se presento. Para la cepa de B. melitensis 16 M, Diaz y cols. (1981) informan un rendimiento de 5% en la primera precipitacion y de 1.5 % en la segunda precipitacion, esto es casi tres veces mas de lo obtenido con la cepa rugosa de Brucella melitensis B-115, nuestros resultados fueron de 0.425 g/ml en B. melitensis 16M y de 0.213 g/ml para B. melitensis B-115 concordando con los autores mencionados. Con respecto a B. abortus 99S con la tecnica de tris-fenol no se tiene un dato reportado y con la tecnica de TCA no se efectuó; aunque Jones y cols. (1980) informan que en la extraccion de Poly B en B. abortus 19R o 45/20 y R. canis con TCA no se obtuvieron resultados positivos.

Con la cantidad de microorganismo empleada (B-115:195 gr; 16M:326 gr) se tiene un rendimiento aparentemente

pequeño, sin embargo no es así, sobre todo con la técnica de tris-fenol, la cual mostro un rendimiento mayor para ambas cepas: Brucella melitensis B-115 (0.213 g/ml) y B. melitensis 16M (0.425 g/ml), además se debe tomar en cuenta que la cantidad a utilizar en Doble Difusión es muy pequeña (30 mccl) y esta muestra se diluyo en razón de 1:4, pudiendose probar simultaneamente cinco sueros de animales. R. Diaz y cols. (1981), informan que con el Poly B obtenido de 35 gr de celulas secas de B. melitensis 16 M, teoricamente se pueden estudiar 52,500 sueros, en contraste con los 875 que se estudiarian con el Poly B extraido de B. melitensis B-115 pero trabajar con la B-115 es mas seguro. La prueba de pureza con los antisueros A y M nos brinda un buen resultado ya que de acuerdo a: Moreno y cols. (1979 y 1981); Diaz y cols. (1968, 1979 y 1981); Fernandez y cols. (1982); Leong y cols. (1970); Brinley, estos antigenos estan presentes en las cepas de B. melitensis 16M y B. abortus, no así en la cepa rugosa de B. melitensis B-115. Teniendo en cuenta lo anterior, era de esperar resultados positivos en los extractos de las cepas 16M y 99S antes de la purificación y una ausencia de ellos despues de efectuada la purificación, lo cual indica tambien la carencia de lipopolisacarido, ya que estos componentes antigenicos A y M se encuentran en el complejo lipopolisacarido, Diaz y cols. (1968), de ambas bacterias solo que en distinta proporcion, pues se ha visto que la cepa lisa de B. melitensis contiene mas aglutinogenos M mientras que la cepa de B. abortus posee mas aglutinogenos A. Diaz y cols. (1968) y Brinley (1970). Los resultados obtenidos en doble difusion con los distintos antigenos de poly B purificados y los lipopolisacaridos de B. abortus y Salmonella spp estan de acuerdo con lo informado por Diaz y cols. (1979), ya que fueron negativos en la prueba de pureza, mientras que ambos lipopolisacaridos mostraron una linea de identidad parcial. Estos resultados confirman los reportes previos de Leong y cols. (1970), Moreno y cols. (1979) y Diaz y cols. (1974), quienes han demostrado que B. melitensis 16M y B. abortus spp junto con enterobacterias como Yersinia enterocolitica serotipo O9, Salmonella spp y Escherichia coli poseen varias propiedades estructurales y biologicas en comun.

El extracto de B. melitensis B-115 por carecer de lipopolisacarido resulto negativo en cuanto al contenido de antigenos A y M tal y como lo describen Diaz y cols. (1979) Moreno y cols. (1961), y Fernandez y cols. (1982); en nuestro trabajo se efectuo la prueba de pureza en doble difusion con los lipopolisacaridos de B. abortus y Salmonella spp obteniendose resultados negativos, lo cual era de esperarse por lo descrito anteriormente. Para determinar la concentracion optima de Poly B en doble difusion, se realizo esta con distintas concentraciones de antígeno que variaron desde 0.425g/ml hasta 27mcg/ml, siendo la optima de 106.25 mcg/ml. La concentracion de antígeno que

pequeño, sin embargo no es así, sobre todo con la técnica de tris-fenol, la cual muestra un rendimiento mayor para ambas cepas: Brucella melitensis B-115 (0.213 g/ml) y B. melitensis 16M (0.425 g/ml), además se debe tomar en cuenta que la cantidad a utilizar en Doble Difusión es muy pequeña (30 mcl) y esta muestra se diluye en razón de 1:4, pudiéndose probar simultáneamente cinco sueros de animales. R. Diaz y cols. (1981) informan que con el Poly B obtenido de 35 gr de células secas de B. melitensis 16 M, teóricamente se pueden estudiar 52:000 sueros, en contraste con los 575 que se estudiarían con el Poly B extraído de B. melitensis B-115 pero trabajar con la B-115 es más seguro.

La prueba de pureza con los antisueros A y M nos brinda un buen resultado ya que de acuerdo a: Moreno y cols. (1979 y 1981); Diaz y cols. (1968, 1976 y 1981); Fernandez y cols. (1982); Leong y cols. (1970); Brinley (1970), estos antígenos están presentes en las cepas de B. melitensis 16M y B. abortus, de así en la cepa rugosa de B. melitensis B-115. Teniendo en cuenta lo anterior, era de esperar resultados positivos en los extractos de las cepas 16M y 99S antes de la purificación y una ausencia de ellos después de efectuada la purificación, lo cual indica también la carencia de lipopolisacárido, ya que estos componentes antigenicos A y M se encuentran en el complejo lipopolisacárido, Diaz y cols. (1981), de estas bacterias solo que en distinta proporción, pues se ha visto que la cepa lisa de B. melitensis contiene más antígenos M mientras que la cepa de B. abortus posee más antígenos A. Diaz y cols. (1968) y Brinley (1970). Los resultados obtenidos en doble difusión con los distintos antígenos de poly B purificados y los lipopolisacáridos de B. abortus y Salmonella spp están de acuerdo con lo informado por Diaz y cols. (1979), ya que fueron negativos en la prueba de pureza, mientras que ambos lipopolisacáridos mostraron una línea de identidad parcial. Estos resultados confirman los reportes de Leong y cols. (1970), Moreno y cols. (1979) y Diaz y cols. (1974), quienes han demostrado que B. melitensis 16M y B. abortus spp junto con enterobacterias como Shigella enterocolitica serotipo 09, Salmonella spp y Enterobacter coli poseen varias propiedades estructurales y fisiológicas en común.

El extracto de B. melitensis B-115 por carecer de lipopolisacárido resulto negativo en cuanto al contenido de antígenos A y M tal y como lo describen Diaz y cols. (1979) Moreno y cols. (1981), y Fernandez y cols. (1982); en consecuencia se efectuó la prueba de pureza en doble difusión por los lipopolisacáridos de B. abortus y Salmonella con diferentes resultados negativos, lo cual era de esperarse por lo descrito anteriormente.

Para determinar la concentración óptima de Poly B en doble difusión se realizó esta con distintas concentraciones de antígeno que variaron desde 0.425g/ml hasta 27mcg/ml, siendo la óptima de 0.625 mcg/ml. La concentración de antígeno que

menos un año despues de la vacunacion y no es posible diferenciar la enfermedad, de la vacunacion y el diagnóstico serológico de un animal llega a ser difícil sino imposible (Alton, 1987).

Todo lo anterior contribuyo a que los animales estudiados en este grupo presentaran respuestas serológicas semejantes (cuadro 7 y cuadro 9) tanto en las pruebas de aglutinacion como en Fijacion de Complemento, por lo que es indistinto el emplear cualesquiera de estas pruebas en el diagnóstico de la presencia de anticuerpos. Blasco (1982) menciona que la evolucion post-vacunal en el porciento de reactivos positivos en las pruebas de Fijacion de Complemento e Inmunodifusion Radial asi como en Doble Difusion varia cuantitativamente la cantidad de Poly B a emplear en estas dos ultimas pruebas, por lo que se hace necesario una estandarizacion del Antigeno Poly B a usar.

En el cuadro 8 se muestran todos los resultados obtenidos con cada una de las pruebas serologicas realizadas a los animales no vacunados. Aqui se aprecia que el numero de sueros positivos en cada prueba no difiere significativamente al igual que en el grupo de animales vacunados. Sin embargo, al hacer la agrupacion de datos por pruebas (cuadro 10) se observa que existe una diferencia de reactivos positivos considerable entre las prueba de Fijacion de Complemento y la prueba de Tarjeta para abortus que no son detectadas por la prueba de Doble Difusion. Cabe mencionar que el antigeno empleado en las pruebas de Fijacion de Complemento y Tarjeta para abortus fue el antigeno de B. abortus estandarizado y producido por Pronobive mientras que en las prueba de tarjeta para melitensis se empleo el antigeno de B. melitensis 16M donado por la Escuela Nacional de Ciencias Biologicas del I.P.N. y en la prueba de Doble Difusion los antigenos obtenidos por nosotros, es de importancia señalar que en estos dos ultimos casos los antigenos no estaban estandarizados.

Blasco y cols. (1982) obtienen una buena correlacion entre los titulos de Fijacion de Complemento y el numero de sueros positivos en Doble Difusion obtenidos de animales no vacunados, a los cuales se les habia aislado la bacteria de B. melitensis biotipo 1 y 3 con anterioridad, menciona tambien que la prueba de Inmunodifusion Radial puede ser un gran auxiliar en el diagnóstico de infeccion de B. melitensis en borregos y cabras solo que los problemas que se asocian son la produccion del antigeno en gran escala y su titulacion seguida de la estandarizacion.

La no estandarizacion del antigeno Poly B en Doble Difusion y cepa de B. melitensis en la prueba de tarjeta y Doble Difusion no permite conocer la cantidad exacta de antigeno y microorganismo en un volumen dado y por lo tanto la respuesta asi obtenida en el resultado de estas pruebas no es confiable y si muy dispersa.

Por otro lado, Waghela (1978) reporta que la prueba de Fijación de Complemento es la única capaz de detectar anticuerpos en todos los animales infectados a través de un periodo de 304 días.

Debido a que los animales vacunados con Rev-1 como los infectados presentan anticuerpos circulantes detectables por Fijación de Complemento y pruebas de aglutinación en un periodo de casi un año (Waghela, 1978; Blasco y cols., 1982; Alton y cols., 1987) no fue posible diferenciar en este estudio a los animales vacunados de los animales infectados.

CONCLUSIONES

- El mayor rendimiento de Poly B se obtuvo a partir de la cepa lisa 16M y con la técnica de Tris-fenol, aunque el rendimiento obtenido con la técnica de T.C.A. también resulta ser aceptable, sin embargo hay que tomar en consideración la virulencia de cada cepa, así como el manejo dado en la técnica elegida, ya que un descuido puede ocasionar infecciones en el personal que trabaje con ellas.
- El Poly B extraído de cualquiera de estas cepas resulta adecuado para su empleo en la prueba de Doble Difusión siempre y cuando se conozca su grado de pureza y se realice una estandarización del antígeno.
- El costo por cada prueba de Doble Difusión comparado con las que se efectúan en un laboratorio particular se incrementa de un 15 a 16% sin embargo, esta prueba es de fácil y rápida ejecución una vez obtenido el Antígeno.
- Todas las pruebas empleadas detectan anticuerpos circulantes en cabras, sin embargo debido a la respuesta serológica que se genera con la infección y la vacunación a distintas dosis, no fue posible diferenciar animales que padezcan la enfermedad y animales vacunados.

B I B L I O G R A F I A

- 1.-Alton, G.G.(1970). Vaccination of Goats with Reduced Doses of Rev. 1 Brucella melitensis Vaccine. Res. Vet. Sci. vol.II (54). pp 54-59.
- 2.-Alton, G.G.; Maw, J.; Rogerson, B.A.; and McPherson, G.G. (1975). The Serological Diagnosis of Bovine Brucellosis: An Evaluation of the Complement Fixation, Serum Agglutination and Rose Bengal Tests. Austr. Vet. J., vol 51 pp 57-63.
- 3.-Alton,G.G.; Jones,L.M.; Pietz,D.E. (1976). Las Tecnicas de Laboratorio en la Brucelosis. OMS/FAO, 2 ed.,pp 89-119, 1976.
- 4.-Alton, G.G.(1978). Recent Developments in Vaccination Against Bovine Brucellosis. Austr. Vet. J., vol. 54 pp 551-557.
- 5.-Alton, G.G.(1987). Control of Brucella melitensis infection in Sheep and Goats - a Review. Trcp. Anim. Hlth. Prod., vol. 19 pp 65-74
- 6.-Anderson,T.D.; Meador,V.P. and Cheville,N.F.(1986). Pathogenesis of Placentitis in the Goat Inoculated with Brucella abortus. I. Gross and Histologic Lesions. Vet. Pathol. vol 23 pp 219-226.
- 7.-Angulo,B.G. y Villa, S.J. (1985). Comparacion entre las tecnicas de extraccion con fenol y acido tricloroacetico para la obtencion de Antigeno Poly B para el Diagnostico de Brucelosis. Memorias de la Reunion de Investigacion Pecuaria en Mexico. pp 47.
- 8.-Berman, D.T. and Jones, M.L.:Radial Immunodiffusion, a Confirmatory Test for Fovine Brucellosis. J. Clin. Microbiol. 12,(6):116-127.
- 9.-Blasco,J.M.; Diaz,R.; Moriyon, I. and Salvo,M.D. (1982). Evaluation of Radial Immunodiffusion Test for Diagnosis Brucellosis in Sheep and its Possible value for Differentiating infected from Brucella Melitensis Rev-1 Vaccinated Sheep. Develop. Biol. Standard. vol 56, pp 507-511.
- 10.-Brimley,M.W.J. (1970). Reviews of the Progress of Dairy Science. Sec E. Diseases of dairy cattle. Brucellosis. J. Dairy Res. vol. 37 pp 302-345.

- 11.-Cortes, M.L. (1987). Comparacion de los Polisacaridos-B de tres cepas diferentes de B. melitensis utilizados en el Diagnostico de Brucelosis Bovina. Tesis Q.F.B. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, U.N.A.M.
- 12.-Diaz, R.; Jones, L.M.; Leong, D. and Wilson, J.B. (1968). Surface Antigens of Smooth Brucellae. J. Bact., vol 96 (4), pp 893-901.
- 13.-Diaz, R. and Bosseray, N. (1974). Estudio de la Relaciones Antigenicas entre Yersinia enterocolitica serotipo IX y otras Especies Bacterianas Gram Negativas. Microbiol. Esp. vol 27 pp 1-14.
- 14.-Diaz, R.; Garatea, P.; Jones, L.M. and Moriyon, I. (1979). Radial Immunodiffusion Test with a Brucella Polysaccharide Antigen for Differentiating Infected from Vaccinated Cattle. J. Clin. Microbiol., vol 19, pp 37-41.
- 15.-Diaz, R.; Toyos, J.; Salvo, M.D. and Pardo, M.L. (1981). A Simple Method for the Extraction of Polysaccharide B from Brucella cells for use in the Radial Immunodiffusion test Diagnosis of Bovine Brucellosis. Ann. Rech. Vet., vol 12 (1), pp 35-39.
- 16.-Dubois, M.; Giles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A. and Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Ann. Chem. vol 28 pp 350-356.
- 17.-Fernandez, L.; Moriyon, L.J.; Toyos, J. and Diaz, R. (1982) Immunological Identity of Brucella Native Hapten, Polysaccharide B, and Yersinia enterocolitica Serotype 9 Native Hapten. Infec. Immun., vol 38 pp 778-780.
- 18.-Flores, C.R. (1978). Memorias de Actualizacion del Foro Nal. sobre Brucelosis. F.E.S.C., U.N.A.M.
- 19.-Flores, C.R. (1986). Brucelosis en Principales Enfermedades de los Ovinos y Caprinos. Ed. Tortora, J. y Pijoan, P.
- 20.-Hitos, O.F., Angulo, B.G.: Manual de Generalidades sobre Brucelosis. Subdirec. de Ref. en Salud Animal, D.G.S.A., S.A.R.H. (1982).
- 21.-Iannelli, D.; Diaz, R. and Bettini, T.M. (1976). Identification of Brucella abortus Antibodies in Cattle Serum by Single Radial Diffusion. J. Clin. Microbiol., vol 32 pp 203-205.

- 22.-Jawest, E., Melrick, J.L., Adelberg, E.A. (1979). Manual de Microbiologia Medica. Ed. Manual Moderno, pp 258-260
- 23.-Jones, L.M.; Berman, D.T.; Moreno, E.; Deyoe, D.L.; Gilsdorf, M.J.; Huber, J.D. and Nicoletti, P. (1980). Evaluation of Radial Immunodiffusion Test with Polysaccharide B Antigen for Diagnosis of Bovine Brucellosis. J. Clin. Microbiol., vol 12, pp 753-760.
- 24.-Kolar, J. (1984). Diagnosis and Control of Brucellosis in Small Ruminants. Prev. Vet. Med., vol 2, pp 215-225.
- 25.-Leon, A.P.; Osollo, G. y Cano, C. (1962). Inmunidad Natural Innata para la Brucella melitensis. Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop. vol XXII (3 y 4) pp 145-172.
- 26.-Leong, D.; Diaz, R.; Milner, K.; Rudbach, J. and Wilson, J.B. (1970). Some Structural and Biological Properties of Brucella Endotoxin. Infec. Immun., vol 1 (2), pp 174-182.
- 27.-Moreno, E.; Pitt, M.W.; Jones, L.M.; Schurig, G.G. and Berman, D.T. (1979). Purification and Characterization of Smooth and Rough Lipopolysaccharides from Brucella abortus. J. Bact., vol 138 (2), pp 361-369.
- 28.-Moreno, E.; Speth, S.L.; Jones, L.M. and Berman, D.T. (1981). Immunochemical Characterization of Brucella Lipopolysaccharides and Polysaccharides. Infec. Immun., vol 31 (1) pp 214-222.
- 29.-Nielsen, K. and Wright, P.F. (1984). Enzyme Immunoassay and its Application to the Detection of Bovine Antibody to Brucella abortus. Published by Agriculture Canada, Ministry of Supply and Service. Canada. pp 1-20
- 30.-Nicoletti, P. and Carlsen, W.B. (1981). Indirect Hemolysis Test in the Serodiagnosis of Bovine Brucellosis. Am. J. Vet. Res. vol 42 (9) pp 1494-1497.
- 31.-Peterson, G.L. (1979). Review of the Folin Phenol Protein Quantitation Method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. Anal. Biochem. vol 100 pp 201-220.
- 32.-Rio, J.A.; Rodriguez, G.A. (1984). La Brucelosis Caprina en Mexico, Situación Actual y Perspectivas de Control. Primer Congreso Nal. de la Asociación Mexicana de Zootecnistas y Técnicos en Caprinicultura A.C., Queretaro, Qro.

- 33.-Rodriguez, de L.S.V.(1981). Estudios sobre un Antigeno Polisacarido de Brucella y aspectos epizootiologicos de brucelosis en el Chiguire (Hydrochoerus hydrochaeris). Tesis Maestro en Ciencias Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, U.N.A.M.
- 34.-Sutherland,S.S. (1980). Immunology of Bovine Brucellosis. Vet. Bull., Vol. 50 (5) pp 359-368.
- 35.-Schurig,G.G. (1982). The immune Response of Goats Vaccinated with Low and High Doses of Brucella melitensis REV 1. Vet.Immun. Immunopathol., vol 3, pp 311-324.
- 36.-Tabatabal,L.B.; Deyoe,B.L. and Ritchie,A.E. (1979). Isolation and Characterization of Toxic Fractions from Brucella abortus. Infec. Immun., pp 668-679.
- 37.-Tizard, I.R.(1977). An Introduction to Veterinary Immunology. W.B. Saunder Co. Filadelfia, London, Toronto. pp 139-141.
- 38.-Waghela,S.(1979).Serological Response of Adult Goats infected with Live Brucella melitensis. Brit. Vet. J., vol 134 pp 565-571
- 39.-Waghela,S.; Wandera,J.W. and Wagner,G.G. (1980). Comparison of four Serological Tests in the Diagnosis of Caprine Brucellosis. Res. Vet. Sci., vol 28, pp 168-171.
- 40.-World Health Organization (WHO). (1971): Fifth Report of the Joint FAO\WHO expert Committe on Brucellosis. WHO Technical Report Series # 454:33-44,63-70.