



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

EVALUACION DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD
DE VARIAS PRUEBAS DIAGNOSTICAS USADAS EN
BRUCELOSIS BOVINA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
ROSAMARIA REYES PALACIOS

A S E S O R E S:
MVZ JOSE ANTONIO LICEA VEGA
MVZ RAFAEL PEREZ GONZALEZ
DR. EFREN DIAZ APARICIO

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

54
2ij



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. A.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES-CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLÁN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 20 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

"Evaluación de la sensibilidad y especificidad de varias pruebas diagnósticas usadas en brucelosis bovina".

que presenta la pasante: Rosa María Reyes Palacios.
con número de cuenta: 9057346-4 para obtener el TÍTULO de
Médica Veterinaria Zootecnista.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXÁMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a _____ de _____ de 199__

PRESIDENTE MVZ. Sergio Cortés Huerta.

VOCAL MVZ. José Rojo López.

SECRETARIO MVZ. Rafael Pérez González.

PRIMER SUPLENTE MVZ. Marco Antonio Mendoza Saavedra.

SEGUNDO SUPLENTE M. en C. Alejandro Martínez Rodríguez

INDICE

INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	11
MATERIAL Y METODOS	12
RESULTADOS	20
DISCUSION	21
CONCLUSIONES	23
RECOMENDACIONES	24
ANEXOS	25
BIBLIOGRAFIA	29

Con todo mi amor y cariño dedico este trabajo a la memoria de mis abuelos, al Sr. Fidel Reyes Alvarez y Rosita Gutierrez González, gracias por tantos años de amar, cuidado y apoyo, quiero que sepan que los llevo siempre en mi corazón y sé que desde el cielo me siguen cuidando.

De nada sirve tener una fe que moviera montañas, sin amar nada soy.

Gracias mi amor.

Agradecimientos:

A Dios, por ser el camino, la verdad y la vida que con su fuerza infinita todo es posible.

Al Sr. Isidro y Sra. Consuelo Reyes, por su sacrificio y entrega hacia mi, por su comprensión y amor incondicional, por convertir mi sueño en realidad y por ser mi padre y mi madre, lo que más quiero en el mundo.

A mis hermanos: Lulú, Gerardo y Helenita, seamos amigos por siempre. Los amo mucho.

A toda la familia Reyes y Palacios.

Un agradecimiento especial para el Departamento de Bacteriología de CENID, SAGAR, en especial a:

- Francisco Morales, gracias por tu ayuda y amistad.

- Francisco Velázquez Quezada, por su sabiduría y paciencia.

A mis asesores: al Dr. Efrén Díaz, Dr. Antonio Licea y al Dr. Rafael Pérez, por su ayuda y consejo, mostrando siempre su calidad humana, esperando contar con su apoyo en el futuro.

A la FES-C, por brindarme la formación profesional.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar la sensibilidad y especificidad de las pruebas serológicas de Rosa de Bengala (RB), Rivanol (Rv), fijación del complemento (FC), inmunodifusión radial con hapteno nativo (IDR), aglutinación con factor reumatoide (AFR), ELISA indirecto y ELISA-C. Se estableció la especificidad de las pruebas con sueros de becerras vacunadas con dosis clásica (1×10^9 UFC/ml) de *Brucella abortus* cepa 19 por vía subcutánea, en muestreos mensuales posvacunales por el lapso de un año. Se utilizaron 20 becerras de la raza Holstein de 4 a 6 meses de edad; pertenecientes a la FES Cuautitlán. El día 0, se efectuó la prueba de tarjeta a todas las becarras para seleccionar los animales negativos. Para la evaluación de la sensibilidad se emplearon sueros de bovinos con infección de *B. abortus* demostrada por aislamiento bacteriano y para la especificidad sueros negativos de animales que nunca fueron vacunados. En las pruebas, se emplearon antígenos comerciales de RB, Rv, tubo, además de lipopolisacárido (LPS) y hapteno nativo (HN). Las pruebas empleadas fueron: RB, Rv, FC, ELISA indirecto con LPS, IDR con HN y AFR. Se consideró positivos los sueros que presentaron cualquier grado de aglutinación en la prueba de tarjeta, aglutinación a partir de 1:25 en rivanol, títulos a partir de 1:8 para FC, un halo de precipitación en IDR y para ELISA y AFR se estableció previamente la dilución óptima y el punto de corte. Las pruebas tradicionales (RB, Rv, FC) presentaron muy baja especificidad hasta aproximadamente el octavo mes posvacunación. La ELISA-C resultó ser la prueba más específica ya que no detecta sueros positivos en ninguno de los muestreos, la IDR es la segunda prueba más específica encontrando como positivas siete sueros (falsos positivos) al primer mes posvacunación. ELISA indirecto resultó ser específica hasta el quinto mes posvacunación. La AFR fue la menos específica ya que fue incapaz de diferenciar anticuerpos vacunales de los de la enfermedad y en todos los casos, a excepción de FC, la sensibilidad de las pruebas fue del 100%. Con base a estos resultados se concluye que todas las pruebas evaluadas se pueden emplear para el diagnóstico de brucelosis bovina hasta los 10 meses posvacunación como lo marca la Norma Oficial Mexicana, sin embargo la IDR y ELISA-C se pueden usar como prueba confirmatoria en los casos dudosos y para un diagnóstico diferencial temprano de la enfermedad.

PARCIALMENTE FINANCIADO POR EL INSTITUTE NATIONAL DE LA SANTE ET
DE LA RECHERCHE MEDICALE, FRANCIA, SUBVENCION 3/84NS2.

1. INTRODUCCION.

La brucelosis es una enfermedad infecto-contagiosa de etiología bacteriana ampliamente distribuida en todo el mundo que afecta a los mamíferos domésticos y salvajes, de cualquier edad y sexo. Este es uno de los padecimientos que con frecuencia son adquiridos por los humanos a través del contacto con animales, o bien debido al consumo de alimentos procedentes de animales infectados (13,16).

1.1 Historia.

En los años de 1854 a 1856, se reportaron casos de pacientes con fiebres incomparables con la enfermedades hasta entonces conocidas, sin embargo se cree que ya existía desde los tiempos de Hipócrates (400 años a.C.). En 1886, Bruce descubre el agente causal de la fiebre de Malta, haciendo el aislamiento a partir de muestras de bazo de personas enfermas. En 1897, en Dinamarca el Dr. Bang también descubre la etiología de la enfermedad en el bovino, la cual no se relacionó con la enfermedad humana sino hasta 20 años después (16,23).

La extensión del padecimiento en nuestro país ha sido gradual y en la actualidad se encuentra ampliamente diseminada con una prevalencia promedio en todos los estados superior al 5%, se cree que los primeros animales infectados fueron traídos por los conquistadores. En 1970 se instituye oficialmente una Campaña Nacional, publicándose 11 años más tarde, en 1981 en el Diario oficial de la Federación (DOF). La Campaña tiene como antecedente regulador el Reglamento para la profilaxis de la brucelosis publicado en el DOF en 1942. A partir de Septiembre de 1993, se reinicia la Comisión Nacional para la erradicación de la Tuberculosis Bovina y Brucelosis (CONETB) planificada en varias etapas que propone una estrategia que, de acuerdo al planeamiento internacional de establecimiento de zonas libres de la Organización Mundial de Epizootias, pretende hacer más efectiva y expedita la constatación de hatos libres (4,3,6,20).

1.2 Situación de la brucelosis en México.

La brucelosis bovina es endémica en México, es un problema creciente en nuestro país, existiendo una prevalencia estimada del 10% en el Estado de México así como Sinaloa, Nayarit y Nuevo León, en los demás estados la prevalencia estimada es variable como se observa en la fig. 1 (CONETB 1995).

La explotación de bovinos lecheros en nuestro país cobra gran importancia debido al gran aumento de la población y por lo tanto al aumento del consumo de leche y derivados lácteos (INEGI, 1994).

El consumo total de leche para 1988 fue de 8,771.0 millones de litros de leche, si se compara con el año de 1993 donde el consumo fue de 11,365.1 millones de litros; esto representa un aumento en el consumo entre estos dos años de casi un 30%, por otro lado la producción nacional láctea solo experimenta un ligero incremento del 20% entre estos dos años. Por lo tanto la producción nacional láctea solo cubre el 65% de dicho consumo por lo que el porcentaje restante proviene de la creciente importación de leche (México INEGI, 1994). En la producción de leche, los efectos de las políticas económicas de los precios de garantía de los productos de la canasta básica, que incluyen el lácteo en México, han dado una fuerte disminución en la oferta de la leche producida en establos mexicanos, se ha disminuido el número de cabezas de ganado especializado en la producción de leche de 2 millones a menos de 1 millón entre 1982 a 1988 y en los años de 1991 a 1993 ha habido una disminución en el número de animales importados. Aunado a lo anterior los niveles de importación de leche en polvo, fluida y subproductos de la leche han ido en aumento. En consecuencia las necesidades de la población han sido satisfechas parcialmente con la compra en el mercado internacional del producto deshidratado, debido que fue durante la última década más barato importar que producir.

Desde el punto de vista económico-productivo la enfermedad ha representado una limitante muy seria que ha impedido el pleno desarrollo de la ganadería y produciendo pérdidas económicas, como por ejemplo: las pérdidas económicas para 1990 en un hato lechero constituido por 195 vientres ubicado en el estado de Hidalgo se calcularon en 22,216.57 (Valdespino y Batalla, 1991).

Por el gran impacto económico que representa para la ganadería y por ser una enfermedad perteneciente al grupo de las zoonosis, se justifican ampliamente todas las acciones a favor de su control y erradicación de este padecimiento.

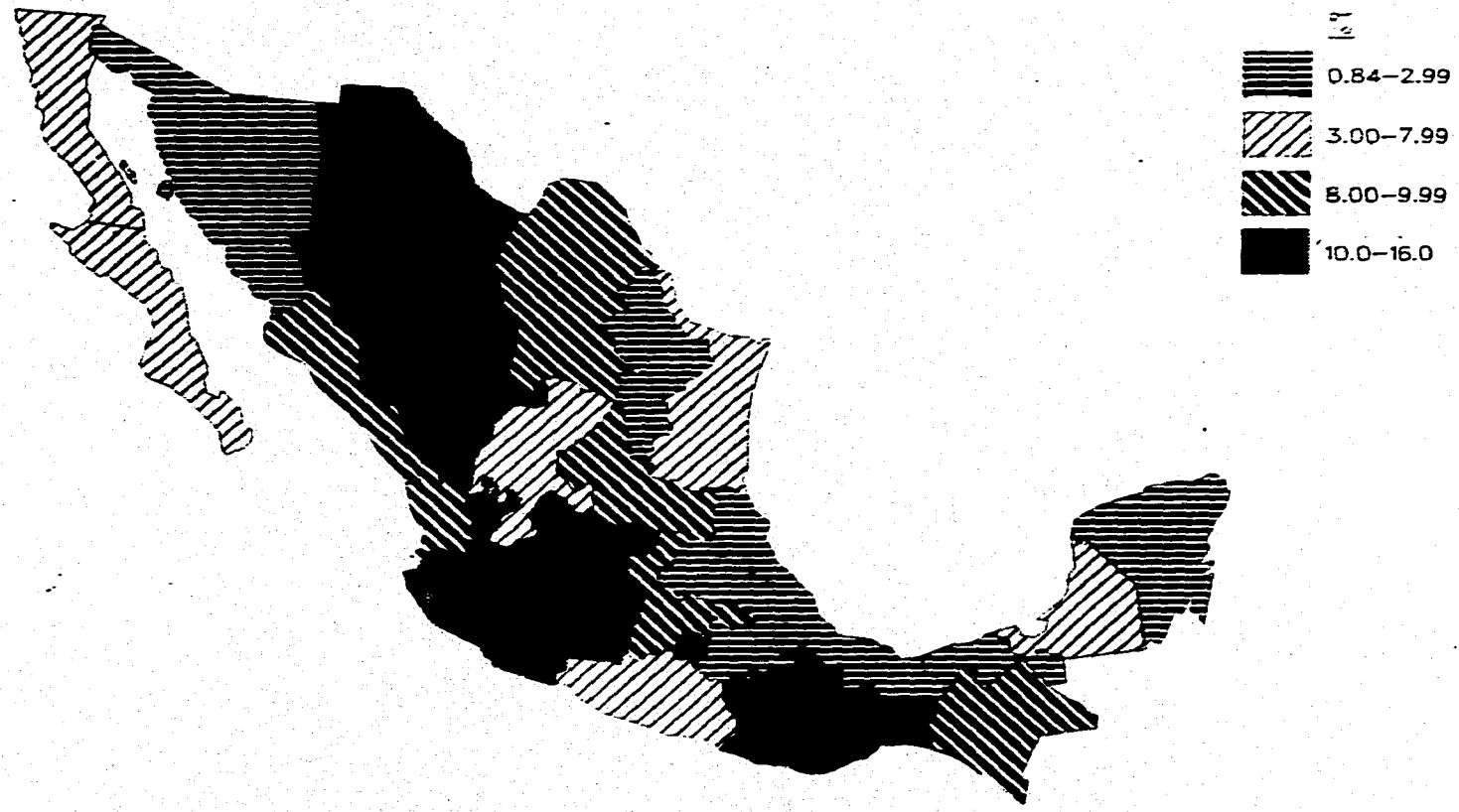
Tabla 1. VOLUMEN DE IMPORTACIONES DE PRODUCTOS PECUARIOS EN MÉXICO.

ESPECIE	1991	1992	1993
BOVINOS	246,88	246,499	129,778
PORCINOS	339,73	117,898	31,847
OVINOS CAPRINOS	976,31	931,832	858,224
AVES	4,212,198	1,390,204	1,990,833
EQUINOS	32,753	10,385	

BRUCELOSIS EN BOVINOS LECHEROS

PREVALENCIA ESTIMADA

1992



FUENTE: CEMEB 1995

1.3 Etiología.

La infección es producida por microorganismos del género *Brucella* (*B*), de forma cocobacilar, los cuales están clasificados como cepas lisas: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*, y las cepas rugosas: *B. ovis* y *B. canis*. La especie bovina está preferentemente infectada por *B. abortus* pero es posible la infección por las otras especies, ocasionalmente por *B. melitensis* cuando cohabitan estrechamente con pequeños rumiantes (2,3,8).

1.3.1 Estructura antigénica del género *Brucella*.

Las brucelas son pequeños cocobacilos (.6 a 1.5 μ m. por .5 a .8 μ m.), Gram negativos, inmóviles, no esporulados, dispuestos en pares o en cadenas muy cortas. In vivo es común la forma cocoide y se observan en pequeños racimos dentro del citoplasma de las células infectadas. No son organismos ácido-alcohol resistentes, pero se tiñen con fucsina básica. Los miembros del género *Brucella* poseen envoltura celular, un espacio periplásmico que contiene al péptido glicano, una membrana citoplasmática.

Con relación a la estructura antigénica de las brucelas, se sabe que existen dos antígenos principales en las cepas lisas, las cuales se conocen como antígenos A y M, siendo estos residuos formados de polihidroxiamino, presente en el lipopolisacárido (LPS) de *B. abortus* y *B. melitensis* la proporción del antígeno A:M en *B. abortus* es de 20:1 y en *B. melitensis* es de 1:20 (2,13).

Las cepas rugosas de *Brucella*, tienen características antigénicas similares entre sí pero diferentes a las cepas lisas. Es importante conocer la estructura antigénica del género *Brucella* ya que parte de la respuesta inmune del animal es función de dicha estructura antigénica.

Estructuralmente la bacteria consta de una pared celular que a su vez se divide en una membrana citoplasmática y una membrana externa, la cual contiene varias proteínas y un lipopolisacárido (LPS) y otros antígenos principales. La respuesta inmune frente a los antígenos bacterianos, es debida en gran parte a la localización de dichos antígenos, su estructura y su función. Esta información es necesaria para comprender el significado de los distintos antígenos en el diagnóstico y protección vacunal (1,2,5,18).

1.3.1.1 Estructura general de las brucelas.

Las brucelas constan de una envoltura celular característica de las bacterias Gram negativas, constituida por una membrana interna y otra externa, y el espacio comprendido entre dichas membranas denominado periplasma donde se encuentran algunas proteínas solubles y un polímero glucopeptídico (mureína o péptidoglicano). La parte exterior de la membrana externa es la única parte de la bacteria que se

encuentra en contacto con el medio ambiente y contiene distribuida asimétricamente fosfolípidos, proteínas y un lipopolisacárido (LPS) (2).

- **LPS:** Es el antígeno inmunodominante de la superficie de las brucelas constituido de una parte lipídica (lípidio A), una cadena O que es la parte polisacárida y una región central o núcleo que es un oligosacárido que sirve de unión entre el lípidio A y la cadena O. El lípidio A es un glucolípidio hidrófobo inserto en la membrana externa de la bacteria y por lo tanto no expuesto al medio externo. El LPS permanece en la membrana externa debido a la interacción hidrófoba del lípidio A con el resto de los componentes del mismo. El LPS posee determinantes antigénicos de las reacciones cruzadas con otros Gram negativos. La cadena O es la responsable de las reacciones cruzadas con *Yersinia enterocolitica* serotipo 9, *Escherichia coli* serotipos O:157, O:116 y O:117 y *Vibrio cholerae*.

La síntesis del LPS tiene lugar en el citoplasma, en la parte interior de la membrana interna, por lo que en el citoplasma podemos encontrar precursores del LPS desprovistos de su componente lipídico, no son inmunogénicos pero reaccionan con anticuerpos específicos anti-LPS y son conocidos como HAPTENOS NATIVOS (HN) (2,5,8,7).

- **Polisacáridos hapténicos de *Brucella*:** Por medio de inmunolectroforesis se ha identificado un segundo componente del LPS de naturaleza exclusivamente polisacárida, esta fracción fue originalmente llamada componente 1, posteriormente segundo polisacárido y después polisacárido B (poly-B). Sin embargo por representar el equivalente del hapteno nativo (HN) de otras bacterias Gram negativas, actualmente se emplea con preferencia la denominación de HN (2).

- **Proteínas y lípidos:** Las envolturas celulares del género *Brucella* están formadas de fosfolípidos siendo el fosfolípido mayoritario el fosfatidiletanolamina y es posible que modulen la respuesta inmune. La membrana externa contiene una variedad reducida de proteínas con tres grupos principales: el 1,2 y 3. Los componentes citoplasmáticos solubles no ofrecen ninguna particularidad con respecto a los otros Gram negativos.

Así, en el citoplasma de *Brucella*, las proteínas solubles y los ribosomas son los componentes antigénicos principales (2,18).

1.4 La Brucelosis como un problema de salud pública.

La brucelosis es una zoonosis donde el hombre es un huésped terminal, la vía de contagio generalmente es la vía digestiva, siendo los productos lácteos contaminados provenientes de cabras, especialmente el queso, los que más frecuentemente la causan. Entre los veterinarios y tabajeros en los rastros es común

que adquieran la infección a través de la piel lacerada y pequeñas heridas y por conjuntiva. La vía respiratoria es la implicada en accidentes de laboratorio y la sanguínea en donadores de sangre asintomáticos de zonas endémicas. En el caso del humano la transmisión por placenta hacia el producto es un evento raro pero factible. El cuadro clínico agudo es difícil de distinguir, al principio la forma insidiosa de la enfermedad se asemeja a un cuadro gripal con la diferencia clave que no hay secreción nasal (2,14,26).

1.4.1 Historia y situación general de la brucelosis en México.

La mayoría de los autores están de acuerdo en que Jeferey Allen Martson, médico cirujano británico, destinado a la Isla de Malta, hizo la primera descripción clínica de esta enfermedad en el hombre, ya se mencionó que Bruce, en una base naval inglesa en Malta descubre un agente microscópico en el bazo de personas con cuadros febriles (13,26).

En México Placeres y Vergara en 1921 reportaron que habían aislado *B. melitensis*. En 1924 Ocaranza y Varela observaron un caso de brucelosis en el Distrito Federal. La cascada de casos inundó al país y los pioneros en investigar la enfermedad tuvieron que fundar un Centro de Brucelosis en México, el cual se fundó en el Hospital General teniendo como responsable al Dr. Maximiliano Ruiz Castañeda aportando valiosas herramientas para el diagnóstico (14).

La incidencia de la brucelosis en México a partir de 1946, tendió a descender hasta 1976 y de ahí se apreció un aumento hasta 1981. Los estados con las tasas más altas en 1992 fueron Coahuila, Guanajuato, Nuevo León, Querétaro, Sonora, Durango, Michoacán, Sinaloa y Tamaulipas y se ha llegado a la conclusión de que mientras no se realice una campaña efectiva para el control de la brucelosis en bovinos y caprinos principalmente, el problema continuara.

El diagnóstico en humanos incluye la prueba de rosa de bengala para el diagnóstico presuntivo y como pruebas confirmatorias se emplea hemocultivo, Fijación de superficie, mielocultivo. Los casos positivos en adultos son tratados con combinaciones de dos antibióticos, tetraciclina y estreptomina y en niños, la rifampicina y estreptomina y puede haber recaídas (26).

La enfermedad en humanos cobra gran importancia económica y social dado que la mayoría de los pacientes infectados están en la edad de trabajar por lo que se pierden horas/hombre, debido a que la brucelosis es una enfermedad debilitante e incapacitante (16).

El Boletín de Epidemiología que se presenta a la comunidad médica de México es el órgano informativo del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SNVE). Su contenido es el producto del acopio, clasificación y análisis de la información que las distintas dependencias del Sector Salud reportan a la Dirección General de Epidemiología (DGE).

1.5 Transmisión y Patogenia.

La bacteria ingresa al organismo animal principalmente por la vía oral, no debe descartarse la vía conjuntival, por inhalación, a través de heridas e incluso el semen, la forma congénita de la enfermedad también es posible. La bacteria es fácilmente fagocitada por los macrófagos pero resisten la destrucción celular ulterior, por lo tanto permanecen a salvo de los mecanismos de defensa por largos períodos de tiempo pudiéndose multiplicar dentro del fagocito ya que es un parásito facultativo y que puede vivir dentro o fuera de las células, esta relación huésped-parásito es muy compleja por lo que el período de incubación es variable y está influenciado por la gestación, número y virulencia de las bacterias, edad y vacunaciones previas. Thoinsen encontró que el período de incubación varía de cincuenta y tres días a doscientos cincuenta días, la incapacidad de detectar animales infectados en periodo de incubación es el problema más grave en la persistencia de la infección en los establos y de la diseminación de la misma hacia otras instalaciones (2,4,16).

En la forma aguda, hay una bacteremia transitoria, la bacteria se multiplica en tejidos orgánicos extracelulares por lo que se dirige hacia los órganos reproductores, además de ganglios linfáticos, glándulas accesorias y menos frecuente en huesos y articulaciones por lo consiguiente el cuadro clínico de la enfermedad se caracteriza en hembras por aborto, retención placentaria, placentitis, absorción embrionaria, partos prematuros con la consecuente baja de la fertilidad y de la producción láctea. En casi todas las vacas infectadas la bacteria se localiza en la glándula mamaria y linfonodos supramamarios, siendo excretados en leche en grandes cantidades (23,27).

El aborto es producido por una colonización del útero y favorecido por un carbohidrato que se produce en este sitio, el eritrol. Las bacterias penetran en los vasos sanguíneos fetales por lo que la circulación de la madre hacia el feto es interrumpida, el aborto ocurre comúnmente en el último tercio de gestación o puede ocurrir antes o después (4).

La lesión en los machos es caracterizada por una orquitis, en el hombre se presentan cuadros febriles recurrentes como manifestación principal de brucelosis, el grado de lesiones varía según las defensas del hospedador, edad, estado de gestación, dosis de exposición y virulencia de la bacteria.

En la forma crónica de la enfermedad, la bacteria vive intracelularmente por lo que el individuo se convierte en portador y permanecen infectados a pesar de que clínicamente no presenten los signos anteriormente señalados.

En el caso de animales domésticos no se recomienda tratamiento alguno, ya que la bacteria es un parásito intracelular facultativo que invade a las células del sistema Reticuloendotelial donde no es factible llevar los antibióticos a niveles terapéuticos (4,13).

1.6 Respuesta humoral frente a los antígenos brucelares.

Cuando un antígeno entra al organismo es recibido por el sistema inmune y lo reconoce como extraño, esta capacidad dicho sistema de reconocer lo propio de lo extraño es sumamente eficaz y ante la ausencia de este " sistema de vigilancia " el individuo moriría por inevitables infecciones masivas. Se ha mencionado el hecho de que *Brucella spp* es un parásito intracelular facultativo; en estas condiciones la respuesta inmune humoral es poco eficaz.

Por su localización en la superficie de la célula y su inmunogenisidad, el LPS es el primer antígeno frente al que aparecen anticuerpos (IgM e IgG) tanto en la infección como en la vacunación. Este hecho puede comprobarse en todas las pruebas que utilizan antígenos celulares (en la que el LPS actúa como antígeno principal) o empleando LPS purificado.

El HN y el poly-B se comportan de manera diferente al LPS, pues al menos en animales de experimentación, la aparición de anticuerpos precipitantes depende de la intensidad del estímulo antigénico (dosis infectante y virulencia). Este resultado guarda probablemente relación con el hecho de que la vacunación con cepa 19 en terneras menores de 6 meses rara vez induce aglutininas frente al poly-B, o al menos estas desaparecen antes de la edad adulta. Por el contrario la infección natural sí lo hace, posiblemente por que la multiplicación activa de la cepa virulenta causa un estímulo antigénico más intenso y prolongado.

Esta hipótesis es coherente con el hecho de que pocos animales en que persiste la cepa vacunal presentan anticuerpos frente al HN. En los bovinos la aparición de anticuerpos anti-proteínas solubles es, en relación con el LPS, tardía y no existe una correlación entre ambos tipos de anticuerpos. Esta observación indica que los anticuerpos anti-proteína soluble son, en brucelosis animal, señal de una infección avanzada. Si bien los bovinos infectados contienen anticuerpos frente a las proteínas de membrana externa, esta respuesta humoral no es comparable a la detectada con el LPS o HN, y carece de utilidad diagnóstica (2,8,7,9).

1.6.1 Respuesta humoral en el contexto infección-vacunación.

De lo discutido hasta el momento se desprende que en la elección de una prueba serológica para ser aplicada al diagnóstico es necesario tener en cuenta frente a qué antígeno queremos detectar anticuerpos. Sin embargo esta información sería incompleta si no considerásemos también que clase de inmunoglobulina (IgM, IgG o IgA) o subclase interesa determinar. Tanto en los animales infectados como en los vacunados con B-19 la respuesta humoral incluye la síntesis de anticuerpos de las clases IgM e IgG, sin embargo en la vacunación el nivel de anticuerpos cae rápidamente de tal manera que a los seis meses no se encuentran IgG2 y solamente persisten bajos niveles de IgM e IgG1. En contraste con los animales infectados persisten después de seis meses altos niveles de IgG1 e IgG2. Aun cuando se ha investigado en detalle, algunos estudios indican que mientras que la infección y

vacunación estimulan la aparición de IgM e IgG frente al LPS, los anticuerpos frente al Polisacárido B y proteínas citoplasmáticas son IgG.

1.7 Diagnóstico de la brucelosis bovina.

Son muy numerosas las pruebas con las que actualmente se cuenta para el diagnóstico de la brucelosis bovina, sin embargo no todas se pueden emplear indistintamente, existirán casos especiales donde se aplicará tal o cual prueba. Para el diagnóstico se cuenta con el aislamiento e identificación de la bacteria, inoculación en animales de laboratorio y la serología (1,2,4,16).

El aislamiento es el método confirmatorio para los animales que padecen brucelosis, se requiere de la muestra adecuada preservada debidamente. Actualmente se cuenta con medios de cultivo selectivos y enriquecidos que permiten un buen crecimiento en el primoaislamiento, inhibiendo eficazmente otros microorganismos contaminantes, el aislamiento de una cepa de *Brucella* sp implica su identificación y tipificación. El conocimiento de la especie y del biotipo es indispensable para el estudio de una población afectada. El empleo de las técnicas serológicas es ampliamente utilizado y se han descrito varios métodos (5).

Las pruebas serológicas no solamente deben identificar a los animales que han estado en contacto con el antígeno. Es preciso poder diferenciar los animales que han sido vacunados y están sanos de aquellos que, habiendo sido vacunados o no, están infectados. Esto es debido a que la vacunación no protege al cien por ciento de los animales. Por lo tanto la prueba serológica ideal sería aquella que fuese capaz de diferenciar los animales infectados de los vacunados, fuese simple de realizar y proporcionase los resultados con rapidez y repetibilidad.

La diferenciación entre infectados y vacunados se realiza interpretando las pruebas serológicas en función del tipo de inmunoglobulina, el antígeno empleado y el estado del animal.

Algunas pruebas serológicas utilizadas son: la prueba de tarjeta o "card test", que es utilizada como prueba "támiz", es decir que a los sueros positivos a esta prueba se les practican métodos confirmatorios como la prueba de rivanol, donde el suero positivo es tratado con lactato de 6,9- Diamino-2-etoxiacridina conocido comercialmente como rivanol, con el fin de precipitar a las inmunoglobulinas del tipo IgM quedando solamente las de tipo IgG, una vez hecho este tratamiento, se procede a realizar la prueba de forma similar a la de tarjeta pero con un antígeno específico.

Si se precisa de una mayor confiabilidad se puede emplear la prueba de fijación del complemento ya que se le considera de alta sensibilidad y especificidad, sin embargo su realización requiere de personal altamente calificado, equipo especializado y de alto costo por lo que esta prueba no siempre es accesible (2,7,8,14,27).

La inmunodifusión radial (IDR) fue descrita originalmente por Díaz y col. en 1970, en esta prueba el HN se incluye en un gel que es depositado en unas placas

especiales, se le practican unas perforaciones donde serán depositados los sueros problema, si algún suero contiene anticuerpos frente al HN se desarrolla un halo de precipitación alrededor del pozo, en el ganado bovino esta prueba presenta gran sensibilidad y especificidad (2,8,10).

Existen otras pruebas que pretenden diferenciar la condición de vacunado e infectado recopilando fenómenos bioquímicos conocidos hasta la fecha, tal es el caso de la **aglutinación con factor reumatoide (AFR)**, la cual para su realización se precisa de una sustancia reductora llamada ditiotreitól (DTT), que como ya se menciono tiene un efecto reductor que inactiva los anticuerpos del tipo IgM, y por otro lado teniendo una suspensión de antígeno con un factor reumatoide aglutinará a los anticuerpos IgG1 diferenciando así los animales vacunados de los infectados (28).

Resientemente se han desarrollado diferentes pruebas indirectas de ensayo inmunoenzimático (**ELISA**) usando diferentes preparaciones de LPS liso, utilizando anticuerpos conjugados de origen monoclonal o policlonal. Sin embargo sigue existiendo el problema de discriminar los vacunados de los infectados. Se pueden emplear otras pruebas para el diagnóstico de brucelosis que no requieren de suero, como la prueba de anillo en leche, prueba de tarjeta modificada para leche y se emplea para estudios epidemiológicos y se requiere de la leche del tanque de enfriamiento y detecta a los hatos infectados (29).

1.7.1 Conceptos de sensibilidad y especificidad.

Hay dos parámetros empleados para medir la capacidad de una prueba diagnóstica en cuanto a la diferenciación entre los animales que tienen la enfermedad y de los que no la padecen. La sensibilidad (expresada en porcentaje) es la capacidad de la prueba para identificar de manera exacta a los animales que tienen la enfermedad, es decir, dar al individuo como positivo.

Parecería que la sensibilidad es lo único que se debe exigir de una prueba, si se puede identificar de manera exacta a todos los animales que padecen la enfermedad, eso sería suficiente. Sin embargo es necesario que se incluyan como casos positivos únicamente aquellos con la enfermedad demostrable. De esta delimitación surge el concepto de especificidad. La especificidad (también expresada en porcentaje) es la capacidad de la prueba para proporcionar datos negativos cuando los individuos investigados realmente no presentan la enfermedad problema. En la actualidad no existe una prueba diagnóstica para brucelosis que tenga 100% de sensibilidad y especificidad, sin embargo se requiere de una sensibilidad y especificidad alta para el diagnóstico oportuno de cualquier enfermedad (2,19,20).

En el presente trabajo se determino la sensibilidad y especificidad de diferentes pruebas diagnósticas para la brucelosis bovina empleando sueros de animales positivos con infección demostrada, negativos y sueros de becerras vacunadas con la dosis clásica de la vacuna de B. abortus cepa 19.

La sensibilidad y especificidad se calcula por medio de las siguientes fórmulas:

$$\text{Sensibilidad: } \frac{\text{positivos verdaderos}}{\text{positivos verdaderos} + \text{negativos falsos}}$$

$$\text{Especificidad: } \frac{\text{negativos verdaderos}}{\text{negativos verdaderos} + \text{positivos falsos}}$$

1.8 Prevención y control.

La brucelosis es una enfermedad difícil de erradicar, lo que ha dado lugar a tomar medidas de carácter preventivo, el objetivo final de la profilaxis debe ser el de la erradicación total de la enfermedad de la zona afectada, para alcanzar dicho objetivo son necesarios:

- Disponer de un sistema adecuado de vigilancia epidemiológica.
- Disponer de medios técnicos, humanos y financieros.

Los instrumentos de la profilaxis son el diagnóstico y la vacunación. Anteriormente se habían puesto muchas esperanzas en vacunas de la cepa H32 ó 45/20 que no han sido satisfactorias para su uso colectivo para la profilaxis oficial. Actualmente solo debe considerarse la vacuna cepa 19. La cepa 19, es una vacuna de microorganismos vivos que consigue una excelente inmunidad que dura toda la vida. Se sabe que de una población de bovinos vacunados, una pequeña proporción de ellos queda infectada con la cepa 19 (2,4,7,14).

A fin de erradicar la brucelosis es necesario utilizar las pruebas serológicas para identificar a los animales infectados, la cepa 19 en su dosis clásica ocasiona una respuesta muy difícil de distinguir de la respuesta característica de la infección. Uno de los métodos para conseguir esta distinción consiste en asegurarse que la cepa 19 solamente se aplique a vaquillas entre 3 y 6 meses de edad, se espera así que la respuesta sérica de anticuerpos se encuentre en cifras bajas cuando el animal llegue a la edad reproductiva, y se aplique cualquiera de las pruebas serológicas para el diagnóstico de la brucelosis bovina. Utilizando la dosis reducida, el animal recibe la vigésima parte de la dosis clásica de la vacuna produciendo buena inmunidad y al mismo tiempo los anticuerpos producidos disminuyen rápidamente (22,27).

2.- OBJETIVOS.

2.1 Objetivo General:

Evaluar y comparar la sensibilidad y especificidad de las siguientes pruebas serológicas: tarjeta, rivanol, fijación del complemento, inmunodifusión radial con hapteno nativo (IDR), aglutinación con factor reumatoide (AFR), ELISA indirecto y ELISA competitivo, que son empleadas en bovinos para el diagnóstico de brucelosis en el hato de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

2.1.1 Objetivo Particular:

Evaluar la especificidad de las pruebas anteriormente mencionadas en becerras vacunadas con la dosis clásica de la vacuna de *Brucella abortus* cepa 19, en muestras mensuales posvacunales por el lapso de 1 año.

3.- MATERIAL Y METODOS.

3.1 ANIMALES.

Se utilizaron 20 becerras de la raza Holstein de entre 4 a 6 meses de edad; los animales pertenecen al Módulo de bovinos productores de leche de la Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán. Al inicio del trabajo, día 0, se efectuó la prueba de tarjeta a las 20 becerras para seleccionar los animales negativos y proceder a la vacunación.

3.2 SUEROS.

Para la evaluación de la sensibilidad y especificidad se emplearon 20 sueros de bovinos positivos a todas las pruebas tradicionales, con infección demostrada por aislamiento bacteriano y 20 sueros negativos provenientes de animales que nunca fueron vacunados y para determinar la especificidad en becerras se utilizaron los sueros mensuales posvacunación.

3.3 VACUNAS.

Se vacunó a las becerras seleccionadas con la dosis clásica (1×10^9 UFC/ML) de la vacuna de *Brucella abortus* cepa 19 elaborada por Productora de Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONAVIVE).

3.4 ANTIGENOS.

Para la realización de las diferentes pruebas, se emplearon diferentes antígenos comerciales de las pruebas de tarjeta, rivanol, y de anillo en leche elaborados por PRONAVIVE - México. El hapteno nativo y el LPS liso de *Brucella melitensis* 16M, usados también como antígenos fueron elaborados en CENID-INIFAP, Bacteriología siguiendo el método de extracción sugerido por Díaz Aparicio.

3.5 TOMA DE MUESTRAS.

Se tomaron muestras serológicas mensuales por un lapso de 12 meses posvacunación de las 20 becerras. Se obtuvo la muestra de la vena coccígea ventral previa antisepsia de la zona con yodo al 2% utilizando aguja y tubo vacutainer por lo que la sangre se obtuvo de un modo estéril. Se dejaron los tubos debidamente

Identificados a temperatura ambiente hasta el momento de llegar al laboratorio donde por centrifugación se separó el suero del coágulo, el suero se depositó en viales y permanecieron congelados hasta el momento en que fueron utilizados.

3.6 PRUEBAS SEROLÓGICAS EMPLEADAS.

A todos los sueros se les practicaron las siguientes pruebas:

3.6.1 Pruebas convencionales: Las pruebas empleadas en todos los sueros fueron: prueba de tarjeta, rivanol y fijación de complemento, descritas por Alton y col. Se consideró positivos los sueros que presentaron cualquier grado de aglutinación en la prueba de tarjeta, una aglutinación visible a partir de 1:25 en rivanol y títulos a partir de 1:8 en el caso de fijación del complemento.

3.6.2 Inmunodifusión radial (IDR): Es una prueba de tipo cualitativo, relativamente rápida y sencilla de realizar. Se practicó la prueba de IDR en un medio hipertónico (10% de NaCl) y utilizando un soporte de gel de agarosa conteniendo una solución amortiguadora de pH al que le fue agregado el hapteno nativo en una concentración óptima de 20 mg/ml. El gel conteniendo el HN fue calentado en baño maría a 60 C y se tomó con una pipeta caliente y se depositaron 3 ml por placa o la suficiente cantidad para proporcionar un espesor de 2 mm. una vez solidificado y dejando pasar 24 h antes de ser utilizado, se le hicieron varias perforaciones en la superficie con sacabocado quedando 2 hileras de aproximadamente 16 pozos. Antes de realizar la prueba los sueros se dejaron a temperatura ambiente y fueron depositados en los pozos y se incluyó un control positivo y otro negativo, la interpretación se realizó después de 24 h de incubación a temperatura ambiente, siendo el suero positivo cuando se presentó un halo o anillo de precipitación alrededor del pozo y fue negativo ante la ausencia de dicho anillo.

3.6.3 Aglutinación con factor reumatoide: Es una prueba serológica, donde se utilizó al ditiotreitól (DTT) como un agente reductor que inactiva los anticuerpos IgM, y por otro lado teniendo una suspensión de antígeno con un factor reumatoide que aglutinará a los anticuerpos de la clase IgG1, esperando así que diferencie los animales vacunados de los infectados. La prueba consta de tres fases, la primera en donde todos los sueros problema fueron tratados con DTT, se depositaron los sueros en microplacas de fondo plano utilizando una hilera (de A a H) por cada suero, primeramente se depositaron en el pozo A 100 ul de una sustancia amortiguadora de pH conteniendo el DTT, enseguida se adicionaron 25 ul del suero problema.

Se incubó la placa en estufa bacteriológica a 37° C por 30 minutos, se sacó la placa transcurrido el tiempo y para detener la reacción se inactivó con la adición de 10 ul de peróxido de hidrógeno.

En la segunda fase se da un fenómeno de aglutinación, que consistió en la adición de una suspensión de antígeno con el factor reumatoide en una dilución 1:4 del antígeno y para las subsecuentes diluciones se añadió en el resto de los pozos (de B a G) 75 ul de una suspensión de antígeno-EDTA y factor reumatoide en este caso el antígeno estuvo diluido 1:20, se tomaron 75 ul del pozo A y se depositaron en B, se homogeneizó y se tomaron 75 ul de B a C, de C a D etc. y al llegar al pozo G donde se desechó el sobrante. Posteriormente las placas fueron incubadas nuevamente a 37 C por 24 h. Esta aglutinación fue leída con un espejo y expresada como positivo en los pozos donde se presentó el fenómeno de la aglutinación y las diluciones fueron en cada pozo, 1:8.25, 1:12.5, 1:25 ... etc. Antes de realizar esta prueba tuvo que elaborarse el factor reumatoide que es un antisuero anti-IgG-bovina elaborado en conejo así como establecer la dilución a partir de la cual se toma como positivo, empleando sueros de bovinos con cultivo positivo a brucelosis así como sueros negativos, por lo que se consideró como positivos a los sueros que presentaron una reacción completa de aglutinación a partir de la dilución 1:25.

Estandarización y punto de corte de AFR.

Se estandarizó la prueba de ARF para obtener la dilución óptima del factor reumatoide que fue de 1:5 y se obtuvo el punto de corte de la misma, por lo que una muestra se consideró positiva a partir del título 1:12.5. En todos los casos se emplearon sueros controles positivos y negativos

3.6.3.1 Elaboración del antisuero conejo-anti-IgG-bovino.

La obtención de buenos antisueros ha llegado a considerarse un arte, cualquier técnica que se desee adaptar para su obtención está basada en la respuesta inmune que tiene todo ser vivo a la aplicación de un antígeno que su Sistema Inmune lo reconozca como extraño. Esto sucede normalmente cuando se aplican hormonas, proteínas, etc., todas estas moléculas de alto peso molecular y de estructura rígida son requisitos suficientes para que pueda ser reconocida como exógena al organismo animal.

Ha de considerarse dos factores muy importantes cuando se desea obtener buenos antisueros: la especie en donde se va a producir y las características que deberá tener el antígeno que se va a inocular. Los mejores antisueros se han obtenido en cabras, cerdo de Guinea y conejos. De otras especies se pueden obtener sueros en mayor cantidad como en el caballo, pero esta especie solo se utiliza para la producción de antisueros a escala comercial, por lo que se recomienda utilizar una especie que facilite su mantenimiento y manejo. Para la elección adecuada de la especie se ha de considerar la respuesta inmune y su intensidad que se espera obtener a la inoculación del antígeno.

Las características que posea el antígeno lo harán de grado inmunogénico variable, en general el antígeno debe ser relativamente puro ya que cualquier fracción contaminante que pueda contener interferirá con la respuesta inmune esperada, sin embargo se sabe que el Sistema Inmune es capaz de responder a una mezcla de antígenos, pero la respuesta será total si se aplica uno a la vez, en otras palabras, los contaminantes presentes podrían competir inmunológicamente con el antígeno, disminuyendo la respuesta del Sistema Inmune.

Se inocula el antígeno con sustancias que le confieran ciertas características especiales. Estas sustancias generalmente son aceites minerales con un emulsificante al que se le ha añadido bacterias muertas del género *Mycobacterium*, es el adyuvante completo de Freund (ACF). Las micobacterias (que pueden ser de humano o de bovino) ocasionarán una respuesta inflamatoria en los linfonodos regionales y causarán un granuloma en el sitio de inyección, su función principal es de proteger al antígeno de ser degradado por lo que su vida media en el suero sanguíneo aumenta y permite ser liberado gradualmente del sitio de inyección, por lo que el antígeno, gracias a la adición del ACF será altamente inmunogénico. El protocolo de inmunización a seguir dependerá sobre todo del antígeno que se va a inocular, su cantidad y la especie animal donde se va a producir.

Se han ensayado protocolos de inmunización con diferentes dosis de inóculo pero en general se ha establecido que las dosis del antígeno pueden ser, dependiendo de su pureza, de .1 a 1 mg. de antígeno por peso vivo del animal. En la primera aplicación se aconseja aplicar el 50% de la dosis total. El tiempo en que se podrán obtener máximos títulos de antisuero es variable, pero se recomienda obtener sueros tempranos ya que no causarán reacciones cruzadas con otros antígenos al contrario de usar sueros tardíos en los cuales se baja su especificidad.

Para la obtención del antisuero que se utilizó se emplearon tres conejos machos de 5 semanas de edad de la raza Nueva Zelanda de aproximadamente 2 Kg, provenientes del Bioterio del Centro Médico Nacional siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

Se utilizó el protocolo de inmunización para la obtención de anticuerpos contra proteínas plasmáticas e inmunoglobulinas. El antígeno fue IgG bovina purificada y liofilizada conservada en refrigeración hasta el momento que fue empleada y se pesó una báscula analítica en las cantidades requeridas.

- 1.- Se mezclaron 5 mg del antígeno en 1 ml de ACF y se inoculó a un conejo por vía subcutánea en la espalda cerca de la base del cuello.
- 2.- Se repitió el procedimiento a los 15 días con las mismas cantidades anteriores pero utilizando el adyuvante incompleto de Freund, para minimizar el riesgo de una reacción de hipersensibilidad de tipo I.
- 3.- El día 30 se inocularon .250 mg del antígeno diluido en solución salina y se empleó la vía intramuscular.
- 4.- El día 31 se inocularon .500 mg del antígeno diluido nuevamente la solución salina y se aplicó por vía intramuscular.

- 5.- El día 32 se inculó 1 mg del antígeno en solución salina por vía intramuscular.
- 6.- Se sangró al conejo a los 7 días después de haber aplicado la última dosis, utilizando un método que permitió obtener el máximo de volumen sanguíneo y por lo tanto de suero que consistió en incidir con bisturí directamente la cavidad abdominal previa tranquilización y anestesia del conejo, se localizó la arteria aorta en su porción descendente se disecó cuidadosamente y se insertó un cateter endovenoso, heparinizado previamente y conectado a una manguera que finalmete virtió la sangre en un vaso de precipitados de este modo se obtuvieron un máximo de 200 ml se sangre por conejo aproximadamente.

La sangre recolectada fué conservada a temperatura ambiente durante 24 h. posteriormente se centrifugó por fracciones de este modo se obtuvieron 120 ml de antisuero que permaneció congelado hasta el momento de su utilización.

Para comprobar la presencia de anticuerpos contra IgG bovina presentes en el suero recolectado, se hicieron ensayos en tubo capilar y en gel de agarosa donde fué depositado el antisuero y enfrentado a concentraciones diferentes de IgG bovina y suero bovino y finalmente se observaron líneas de presipitación por lo que se dedujo que el suero de conejo contenía anticuerpos contra IgG bovina, cabe señalar que la naturaleza de la anti-IgG-bovina es policlonal.

Evaluación del suero conejo-anti IgG-bovina (factor reumatoide).

Para la realización de ARF se evaluó el factor reumatoide con una inmunodifusión simple en gel de agarosa, donde se enfrentó el antisuero a un suero de bovino y a una solución de IgG bovina (que fue empleada como antígeno para la elaboración del antisuero), y se observaron líneas de identidad, por lo que el factor reumatoide presentó anticuerpos anti IgG bovina.

3.6.4 ELISA Indirecto con LPS: Se realizó sobre microplacas de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano. Tras una titulación previa, el LPS liso de *B. melitensis* 16M se empleó a 2,5 mg/ml en búfer carbonato (0.06M, pH 9.6). La adsorción se consiguió añadiendo a los pocillos 100ml de esta solución e incubando durante 24 h. a 37 C. El antígeno no adsorbido, se retiró mediante tres lavados con PBS-Tween, se sellaron las placas y se guardaron a 4 C. Los óptimos de dilución de suero, dilución del conjugado y tiempos de coloración del sustrato fueron determinados previamente empleando sueros control. La técnica finalmente fué realizada como se describe a continuación:

- 1.- Incubación de 100 ml de suero problema, diluido en PBS durante 60 minutos a 37^o C.
- 2.- Lavado tres veces con PBS-Tween.

- 3.- Incubación (60 min, 37 °C) de 100 µl de conjugado, como conjugado se empleó proteína G.
- 4.- Lavado tres veces con PBS-Tween.
- 5.- Adición de 100 µl de sustrato e incubación durante 15 min. a temperatura ambiente. Como sustrato se utilizó ABTS (Sigma Chemical Co.) (5 mg de búfer citrato 0.05M pH 4 más 19 ml de H₂O₂ al 1.2%).
- 6.- La lectura se realizó a los 15 min, sin detener la reacción, a una longitud de onda de 405 nm en un espectrofotómetro múltiple, provisto de un registrador de datos.

Para estandarizar los resultados se tomó como referencia la densidad óptica (D.O.) obtenida para una sola dilución con uno de los sueros control positivo, elegido al azar. Todas las densidades ópticas de las demás muestras, se convirtieron en porcentaje de ese valor. La dilución utilizada fue aquella para la que se obtuvo una mayor diferencia promedio en la D.O. de los sueros de los animales control positivo y negativo, determinada en experimentos previos.

Estandarización y punto de corte de ELISA-I.

Se estandarizó esta prueba para determinar la dilución óptima de suero que fue 1:200 y usando esta dilución se obtuvo el punto de corte y las lecturas de D.O. a 405 nm. se transformaron en porcentajes con respecto del control positivo usado en cada placa (graf. 1 y 2).

3.6.5 ELISA COMPETITIVO: Para la prueba de ELISA-C, se utilizó el equipo comercial que contiene la placa con el antígeno. Para la realización de esta prueba se descongelaron todos los sueros y se dejaron a temperatura ambiente se depositaron en viales ordenados en la forma que van a estar en la placa. A cada vial se le agregaron 50 µl de suero incluyendo los controles positivo, negativo y blanco que contienen el equipo comercial. Posteriormente se añadió 250 µl del reactivo A que es una solución amortiguadora de fosfatos y 250 µl de reactivo C siendo este el anticuerpo monoclonal y se homogeneizó cada vial en un agitador eléctrico. De esta mezcla se tomaron 100 µl y se depositaron en cada pozo, se incubó 30 minutos a temperatura ambiente en agitación (130 rev/min). Trascorrido el tiempo se lavó la placa 5 veces con la solución A. Se escurrió y secó perfectamente para eliminar cualquier burbuja. Con la pipeta multicanal se tomaron 100 µl del reactivo D, que es el conjugado enzimático (peroxidasa-estraptavidina) y se depositó en todos los pozos se tapó la placa y nuevamente se incubó a temperatura ambiente también en agitación. Se lavó 3 veces con la solución A y una vez con la solución D.

En una tina se depositaron 5 ml de solución E que es el sustrato buferado y 5 ml de solución F siendo el agente cromógeno del sistema, se homogeneizó y de esta mezcla se tomaron 100 µl y se depositaron en todos los pozos, se agita 30 min a

temperatura ambiente y 15 minutos antes de transcurrido el tiempo se enciende el lector. Se realizó la lectura en un lector de ELISA, a una longitud de onda de 405 nm.

Para la interpretación de resultados se hicieron los cálculos recomendados por el equipo comercial, donde se transformaron las D.O obtenidas de cada pozo a porcentaje y tomando en cuenta que las muestras fueron probadas por duplicado.

Con los resultados obtenidos de las diferentes pruebas se elaboraron dos tablas una para la especificidad de las pruebas en los sueros posvacunales y otra para la sensibilidad y especificidad de cada prueba empleada.

ANALISIS ESTADÍSTICO.

Se realizó el análisis estadístico de los resultados mediante el criterio de la prueba de Ji-cuadrada con un intervalo de confianza del 95%, que es una distribución continua basada en la distribución normal. Se define como la suma de cuadrados de variables independientes normalmente distribuidas con media cero y varianza igual a uno. En este trabajo se empleo Ji-cuadrada con la finalidad de establecer diferencias significativas entre los resultados de la misma prueba y diferencias entre los resultados entre pruebas diferentes. Se empleo para dicho analisis el programa estadístico EPI-INFO proporcionado por Epidemiologic Program office centers for disease control Atlanta, USA.

Tabla de Ji-Cuadrada (95% de Intervalo de Confianza) Donde se Comparan los Resultados de cada Prueba con Respecto a los Días Postvacunación. Las Letras en Mayúsculas Denotan las Diferencias Significativas entre las Diferentes Pruebas y las Letras Minúsculas las Diferencias Significativas de la misma Prueba con Respecto a los Diferentes Muestras.

Días postvacunales	Pruebas						
	RB	RV	FC	IDR	AFR	ELISA-I	ELISA-C
0	100	100	100	100	100	100	100
30	0 Aa	0 Aa	0 Aa	65 Ba	0 Aa	0 Aa	100 Aa
60	0 Aa	0 Aa	0 Aa	100 Bb	0 Aa	0 Aa	100 Ba
90	0 Aa	0 Aa	0 Aa	100 Bb	0 Aa	0 Aa	100 Ba
120	0 Aa	0 Aa	0 Aa	100 Bb	0 Aa	11 Cb	100 Ba
150	10 Ab	25 Bb	25 Bb	100 Cb	0 Da	50 Fc	100 Ca
180	55 Ac	70 Bc	70 Bc	100 Cb	0 Da	75 Fd	100 Ca
210	85 Ad	95 Bd	95 Bd	100 Cb	0 Da	80 Ec	100 Ca
240	90 Af	95 Bd	95 Bd	100 Cb	0 Da	90 Ef	100 Ca
270	95 Ag	95 Ad	95 Ad	100 Bb	10 Cb	100 Bg	100 Ba
300	95 Ag	95 Ad	95 Ad	100 Bb	10 Cb	100 Bg	100 Ba
330	95 Ag	95 Ad	95 Ad	100 Bb	40 Cb	100 Bg	100 Ba
360	95 Ag	95 Ad	95 Ad	100 Bb	85 Cb	100 Bg	100 Ba

4. RESULTADOS.

4.1 Resultados de las pruebas diagnósticas.

La prueba serológica que resultó ser la más específica en animales vacunados, en este trabajo, fue ELISA-C, ya que en todos los muestreos provenientes de las becerras vacunadas con dosis completa de *B. abortus* fueron negativos. La IDR fue la segunda prueba más específica ya que solo 7 muestras (el 35%) detectó como positivas a los 30 días después de la vacunación (DV). Por su parte, ELISA Indirecto mostró su máxima especificidad (100%) hacia los 9 meses DV. Las pruebas serológicas tradicionales, RB, RV y FC., dieron resultados positivos (falsos positivos) varios DV. La AFR fue la prueba menos específica ya que fue incapaz de diferenciar los anticuerpos vacunales de los de la infección

Los porcentajes de especificidad de cada prueba en las becerras vacunadas se expresan en la tabla 2.

Las pruebas tradicionales (RB, RV y FC) muestran su máxima especificidad (del 95 %) al día 270 posvacunación, sin embargo IDR al día 60 posvacunación detecta el 100% de los sueros como negativos, lo que representa una ventaja con respecto a las pruebas antes mencionadas. ELISA-C tiene un 100% desde los primeros 30 días posvacunación. La sensibilidad y especificidad de las pruebas empleadas se muestra también en la tabla 3 destacando a ELISA-C como la prueba más sensible y específica (100%).

El análisis de Ji-cuadrada mostró diferencias significativas comparando los resultados entre las diferentes pruebas y comparando los resultados de los muestreos de una misma prueba como se observa en la tabla 4.

5. DISCUSIÓN.

Los resultados obtenidos en el uso de ELISA-C son similares a los reportados por Adams y colaboradores en estudios recientes (24,25), en el cual ELISA-C no mostró ningún resultado positivo en muestras provenientes de becerras vacunadas por cepa 19 y positivos en todos los casos donde se emplearon sueros control con aislamiento bacteriano. La diferencia es que en este trabajo se vacunó en un hato con brucelosis endémica, a diferencia del trabajo de Adams donde fue en una zona libre de la enfermedad lo que le da más realce a la capacidad que tiene el ELISA-C de diferenciar animales infectados de los vacunados. La alta sensibilidad y especificidad de ELISA-C se debe al uso de un anticuerpo monoclonal contra un epítipo común y repetitivo contra el lipopolisacárido que compete diferencialmente con los anticuerpos producidos por la vacunación con la cepa 19, por la infección de brucelosis y otros anticuerpos inespecíficos (24,25).

Otro estudio publicado en 1994 por Poester F.P. y Thiensen S.V. donde se comparó el uso de ELISA-I y ELISA-C para la detección de anticuerpos contra *Brucella abortus*, encontrándose que ELISA-C tuvo un 100% de sensibilidad y especificidad y que puede ser usada como una buena prueba confirmatoria. En el mismo trabajo se concluye que la prueba RB detecta menos falsos positivos que el uso de ELISA-I en animales vacunados, lo que difiere con los resultados obtenidos en el presente trabajo, sin embargo es una buena prueba confirmatoria utilizándola en el momento adecuado.

Al existir diferencias significativas entre los resultados de las pruebas, la especificidad de IDR y ELISA-C si es mayor a la mostrada por Rb, RV y FC aún en el día 360 posvacunación. Se observó también diferencias entre la misma prueba, por lo que se concluye que la especificidad realmente aumenta conforme aumentan los días posvacunación.

Del Refugio, 1990 reportó que los anticuerpos detectados por las pruebas convencionales, en becerras vacunadas con la dosis completa de *B. abortus*, tienden a desaparecer hacia el sexto mes PV, resultados que concuerdan con los obtenidos empleando las pruebas tradicionales. La RB ha sido evaluada por diversos autores (1,2,6) que han demostrado que es la prueba más sensible, pero la que menos capacidad tiene para diferenciar animales vacunados de los infectados. Sin embargo, utilizándola al tiempo adecuado es la prueba que debe utilizarse como prueba de diagnóstico inicial. FC debido a su alta sensibilidad y especificidad se utiliza como prueba confirmatoria en la mayoría de los países pero no diferencia animales infectados de los vacunados recientemente con cepa 19, sin embargo es de gran valor cuando es positiva en animales que fueron vacunados en su etapa juvenil y han pasado MAS DE SEIS MESES DESDE SU VACUNACIÓN como lo marca la Norma Oficial Mexicana.

La IDR también ha sido evaluada por varios autores (2,6,7,9) encontrándose especificidades hasta del 97% en el diagnóstico de vacas infectadas. Berman y Jones han encontrado que su especificidad es del 80%, superior a la de FC en los mismos

casos, lo que concuerda con los datos obtenido en el seguimiento serológico empleando dicha prueba. Presentó una alta sensibilidad es de fácil realización e interpretación con repelibilidad de resultados (2,9,11) pudiendo ser una alternativa para el diagnóstico para el diagnóstico confirmativo en casos dudosos y para un diagnóstico temprano diferencial después de la vacunación

En 1991, Thlang y col. usando la prueba de AFR lograron una especificidad del 78% a los 90 días posvacunación, condición que no se pudo reproducir en el laboratorio en este experimento, encontrando una especificidad similar (85%) pero a los 12 meses posvacunación. La baja especificidad que presentó AFR en el trabajo se debe a la naturaleza policlonal del anticuerpo utilizado ya que puede detectar otra serie de inmunoglobulinas que no son IgG.

6.- CONCLUSIONES.

Al término del presente trabajo se concluyó lo siguiente:

- Las pruebas tradicionales se pueden emplear siguiendo el criterio de la Norma Oficial Mexicana y en el caso de IDR, ELISA-I y ELISA-C pueden ser empleadas como pruebas confirmatorias y en el caso de un diagnóstico temprano y diferencial de la enfermedad.
- De acuerdo con los datos obtenidos al término del presente trabajo se puede concluir que en una explotación de ganado lechero, donde se emplee la vacunación como una herramienta para el control de brucelosis, el diagnóstico de dicha enfermedad por las pruebas tradicionales (RB, RV y FC) se puede implementar hasta los 210 días posvacunación como se observa en la tabla 2, dado que los niveles de anticuerpos detectados por estas pruebas empiezan a descender en este período y la especificidad es baja, es decir que en el período que abarca del día 30 posvacunal al día 210 aproximadamente, las pruebas antes mencionadas son incapaces de diferenciar animales infectados de vacunados.
- El uso de IDR, ELISA-C y ELISA-I representan una ventaja con respecto al tiempo, permitiendo diferenciar rápidamente en el contexto infección-vacunación, lo que permite una adecuada selección de la cría libre de la enfermedad, así como la selección de ganado adulto donde se requiera un diagnóstico temprano si la vacunación ha sido reciente.

7.- RECOMENDACIONES.

El diagnóstico inequívoco de la brucelosis bovina es el directo, consiste en el aislamiento e identificación del microorganismo causal a partir de la leche o tejidos del animal, sin embargo no siempre es posible y en la práctica sobre todo en campañas de erradicación se realiza el diagnóstico mediante métodos indirectos como la serología, sin embargo antes de elegir el tipo de prueba a usar se deberá tener énfasis en los siguientes puntos:

- Estado fisiológico del animal.
- Antecedentes de vacunaciones previas en el hato.
- Historia clínica del animal.
- Tipo de anticuerpo que detecta la prueba.
- Recursos humanos y financieros con los que se cuenta.

Una vez realizado el diagnóstico presuntivo de la enfermedad (utilizando RB) se recurre a pruebas más específicas que ya han sido descritas en que casos se pueden utilizar.

Para el caso específico del hato de la FES-C se recomienda un programa de control y erradicación de la brucelosis que actualmente se realizan las siguientes acciones:

- Diagnóstico serológico de todo el hato, conforme a lo anteriormente señalado.
- Segregación de animales positivos.
- Cría de reemplazos con leche proveniente de vacas negativas.
- Vacunación de la cría de entre los 3 y 6 meses de edad.
- Eliminación de los animales positivos al término de su vida productiva.

La eficacia de dicho programa de control aún no se ha evaluado en términos costo-beneficio.

ANEXOS

TABLA 2. ESPECIFICIDAD EXPRESADA EN PORCENTAJE DE LAS PRUEBAS UTILIZADAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS BOVINA EN BECERRAS VACUNADAS CON LA DOSIS CLÁSICA DE LA VACUNA DE *Brucella abortus* DEL DÍA 0 AL 360 POSVACUNACIÓN.

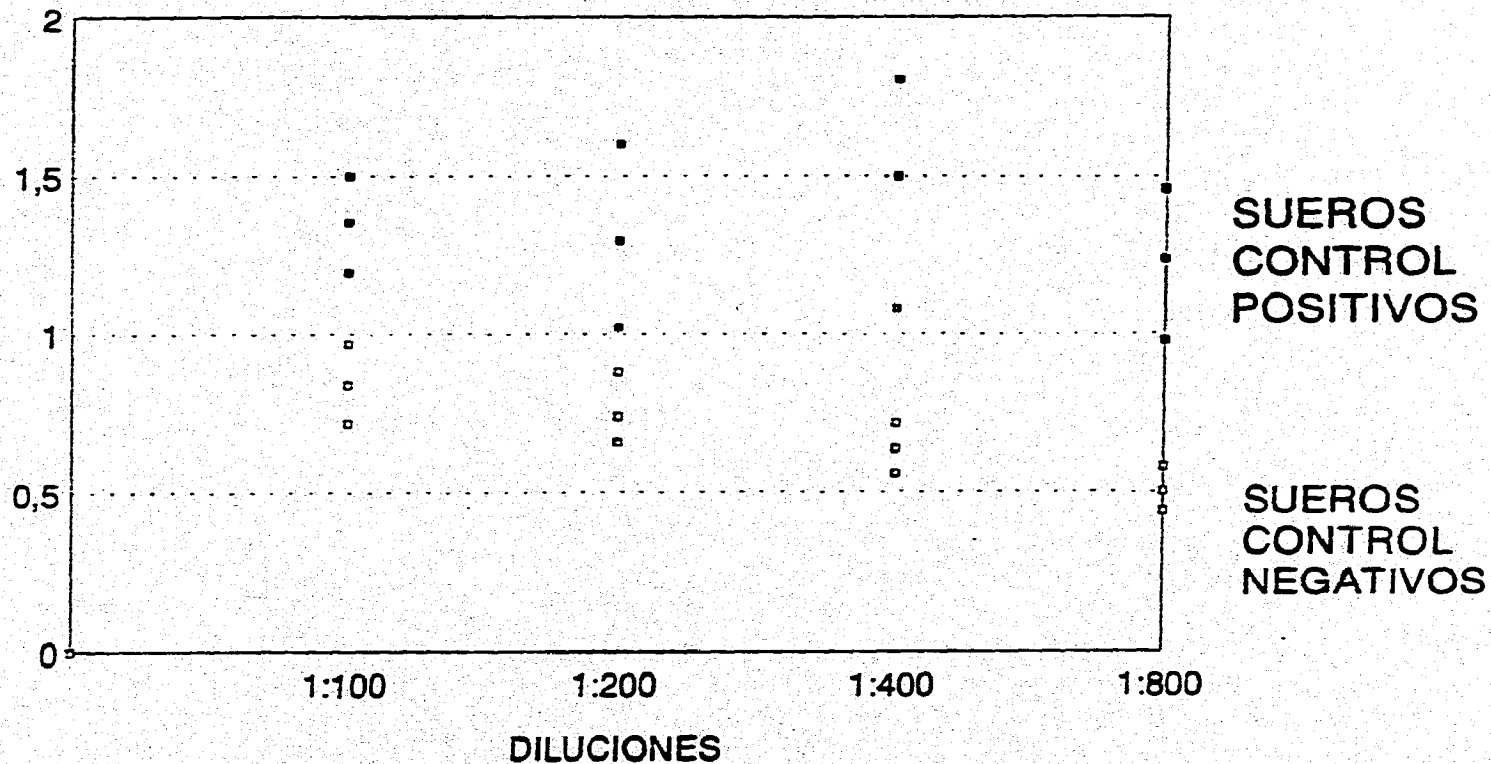
Días postvacunales	Pruebas						
	RB	RV	FC	IDR	AFR	ELISA-I	ELISA-C
0	100	100	100	100	100	100	100
30	0	0	0	65	0	0	100
60	0	0	0	100	0	0	100
90	0	0	0	100	0	0	100
120	0	0	0	100	0	11	100
150	10	25	25	100	0	50	100
180	55	70	70	100	0	75	100
210	65	95	95	100	0	80	100
240	90	95	95	100	0	90	100
270	95	95	95	100	10	100	100
300	95	95	95	100	10	100	100
330	95	95	95	100	40	100	100
360	95	95	95	100	85	100	100

TABLA 3. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD EXPRESADA EN PORCENTAJE DE LAS DIFERENTES PRUEBAS EMPLEADAS UTILIZANDO SUEROS POSITIVOS CON AISLAMIENTO Y SUEROS NEGATIVOS.

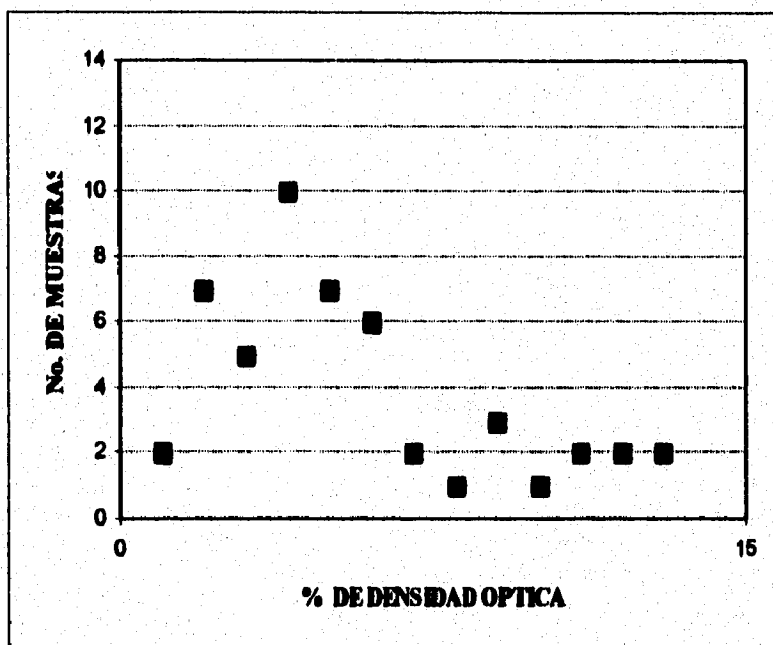
PRUEBA	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
RB	100	100
RV	100	100
AFR	100	100
ELISA-I	100	100
ELISA-C	100	100
IDR	96	100
FC	92	100

GRAFICA # 1 DILUCION OPTIMA PARA EL SUERO EN ELISA-I

PROMEDIOS DE D.O. (450 nm)



GRAFICA 2 PUNTO DE CORTE USANDO LA DILUCIÓN
1:200 DEL SUERO



TESIS

COMPLETA

BIBLIOGRAFÍA.

- 1.- Alton, G.G., Jones,L.M., et al. Techniques for the brucellosis laboratory, INRA, 190p. 1988.
- 2.- Bovis, tratado de Veterinaria práctica. N. 57, Abril, Madrid, España, Editorial Luzán 5.
- 3.- Blasco,J.M., "Estado actual de la brucelosis bovina en España". Bovis (tratado de Veterinaria práctica). 1994,N.57.p 13-17.
- 4.- Blood,D.C., Medicina Veterinaria., Libro de texto de las enfermedades del ganado vacuno, ovino, porcino y equino, 7a. edición, Madrid, España, editorial Interamericana McGraw-Hill, 1992.
- 5.- Corbel,M.J., Morgan,W.J., Brucella. Manual Bergey.
- 6.- Del Refugio,M.S., "Estudio serológico comparativo entre becerras de más de 6 meses de edad, vacunadas con Brucella abortus cepa 19 con dosis reducida y becerras entre edades de 3 a 6 meses con dosis normal". Tesis para obtener el título de Médico Veterinario y Zootecnista, FES- Cuautitlán, UNAM, 1985.
- 7.- Díaz-Aparicio,E., "Diagnóstico serológico de Brucelosis",Tesis doctoral, Universidad de Navarra, España, 1993.
- 8.- Díaz-Aparicio, E., Marin,C., Alonso,B., "Evaluation of serological test for diagnosis of Brucella melitensis infection of goats". Journal of Clinical Microbiology. vol. 32.
- 9.- Díaz,R., Garatea,P., Jones,L.M., Moriyón,I., "Radial immunodiffusion test with a Brucella polysaccharide antigen for differentiating infected from vaccinated cattle". Journal of Clinical Microbiology.10,37-41,1979.
- 10.- Díaz,R., Jones,L.M., "Antigenic relationship of the Gram-negative organism causing canine abortion of smooth and rough". Journal of Bacteriology. 95,618-624, 1968.
- 11.- Fajardo,R. Manual de fisiología veterinaria, Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán, UNAM.
- 12.- Farrel,i.D. "The development of a new selective medium for the isolation of Brucella abortus from contaminated sources". Res. Vet. Sci. 16,280-286, 1974.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 13.- Flores,C.R., Programa de acreditación de médicos veterinarios y zootecnistas., Material para la actualización técnica en brucelosis y tuberculosis bovina., 1a. edición, México., Colegio Nacional de Médicos Veterinarios Zootecnistas de México, 1990.
- 14.- López,M.A., Brucelosis, Avances y perspectivas. INER, 1991.
- 15.- Gázquez, O.A., Patología Veterinaria, 1a edición, Madrid España, editorial Interamericana Mc Graw Hill, 1991.
- 16.- Merck & CO., Inc., El manual Merck de Veterinaria., Un manual de diagnóstico, tratamiento, prevención y control de las enfermedades de los animales domésticos, 3a. edición en español, Madrid, España, editorial Ediciones Centrum técnicas y científicas, S.A., 1988.
- 17.- Morilla, A.G., Inmunología Veterinaria, manual de laboratorio. Ediciones del Patronato de Apoyo a la Investigación y Experimentación Pecuaria, A.C.
- 18.- Morgan,E.J., "The serological diagnosis of bovine brucellosis". Veterinary Record. 80,612-621, 1967.
- 19.- Morgan, W.J., "the diagnosis of Brucella abortus infection in Britain". Bovine Brucellosis: An International Symposium, Crawford Hidalgo, 21-29, 1977.
- 20.- Morton, R.F., Hebel, J.R., Bioestadística y Epidemiología, 2a edición, México D.F., Editorial Interamericana. p. 5920.-
- 21.- Norma Oficial Mexicana de la Campaña contra la Brucelosis Animal. 1994- Diario Oficial, 26 de Enero, México, D.F.
- 22.- Nicoletti,P., "Utilization of the card-test in brucellosis eradication" Jour.Amer.Vet. Ass., 126-151, 1967.
- 23.- Nuñez Torres,E.D., "Evaluación de la prueba diagnóstica de brucelosis, anillo en leche de cabras vacunadas con vacuna de Brucella melitensis REV 1, a dosis reducida." Tesis para obtener el título de BIOLOGO, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, México, D.F. 1994.
- 24.- Overholt,K., Adams L.G., "Evaluation of a competitive ELISA assays as a diagnosis test for bovine and bison brucellosis". Brucellosis Comité United States Animal Health Assoc., October 16-29, 1988, Little Rock, Arkansas.

- 25.- Poester,F.P., Application of enzyme-linked Immunoabsorbent assays for the diagnosis of bovine brucellosis in Rio Grande du sul, Brazil., Instituto de pesquisas veterinárias Desiderio Finamor, Porto Alegre, Brazil., Simposio de brucelosis., XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias, memorias de los diferentes trabajos presentados en el congreso realizado en Acapulco, Gro., México, del 9 al 15 de Octubre de 1994, p 520-523.
- 26.- Secretaría de Salud, 1995. Boletín Epidemiológico, Informe semanal, Año 12, 2:33.
- 27.- Tizard,I., Inmunología veterinaria, 3a edición en español, México D.F., editorial Interamericana McGraw-Hill, 1989.
- 28.- Thiange,P., Brucellose bovine: Le test d' agglutination en présence de facteur rhumatóide après traitement du sérum par le dithiothreitol dans la differemtion des animaux vaccinés et infectés., Ann. Méd. Vét., June, 1992, 136, 471-476.
- 29.- Situación actual de la campaña nacional contra la brucelosis de los animales. Comité en brucelosis., mesa 12., Memoria de la tercera reunión anual del consejo técnico consultivo nacional de Sanidad Animal., 10-14 de Octubre de 1994.