



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA



**EMPLEO DE LA CONTRAINMUNOELECTROFORESIS PARA
DIFERENCIAR ENTRE ANIMALES INFECTADOS Y
VACUNADOS, QUE SON REACTORES POSITIVOS
A BRUCELOSIS POR LAS PRUEBAS DE RUTINA**

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el título de
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P r e s e n t a
RENATO MOTA ALVARADO

ASESORES: M.V.Z. GERARDO ELIAS DILLMAN
M.V.Z. RAYMUNDO ITURBE RAMIREZ



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.

I N D I C E

	Página.
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	3
III. OBJETIVOS	11
IV. MATERIAL Y METODOS	12
V. RESULTADOS	16
VI. DISCUSION	22
VII. CONCLUSIONES	27
VIII. BIBLIOGRAFIA	28

"EMPLEO DE LA CONTRAINMUNOELECTROFORESIS PARA DIFERENCIAR ENTRE ANIMALES INFECTADOS Y VACUNADOS, QUE SON REACTORES POSITIVOS A BRUCELOSIS POR LAS PRUEBAS DE RUTINA"

RENATO MOTA ALVARADO

A S E S O R E S :

MVZ. GERARDO ELIAS DILLMAN

MVZ. RAYMUNDO ITURBE RAMIREZ.

Debido a los problemas que presenta para el diagnóstico de la Brucelosis bovina la vacunación o revacunación de animales adultos, se probó la utilidad de la técnica de CONTRAINMUNOELECTROFORESIS empleando antígenos solubles como prueba complementaria para diferenciar anticuerpos vacunales de los inducidos por una infección de campo.

Se estudiaron 765 muestras séricas de bovinos procedentes del Programa de Rehabilitación de Ganado Criollo y 15 sueros más del Programa de Descentralización de Establos-Lecheros (PRODEL), estos últimos obtenidos de animales en los que se aisló Brucella spp.

A estos sueros se les realizaron cuatro pruebas serológicas de aglutinación: placa, tubo, tarjeta y 2 mercaptotanol. Comparando los resultados obtenidos en estas pruebas

con los obtenidos por medio de la CONTRAINMUNOELECTROFORESIS, en la cual se utilizaron antígenos solubles de B. abortus -- (ASBA) y antígeno soluble de B. melitensis (ASBM).

De los 765 sueros estudiados del Programa de Rehabilitación solo 12 sueros (1.56%) dieron lectura positiva en una o más pruebas de rutina. De los 15 sueros de PRODEL todos (100%) resultaron ser positivos a una o más pruebas de rutina. Todos los sueros reactivos positivos a las pruebas antes mencionadas que tuvieron títulos superiores a 100 UI en la prueba de 2 mercapto-etanol (animales reactivos positivos a Brucelosis), dieron lectura positiva en CONTRAINMUNOELECTROFORESIS mostrando dos líneas de precipitación y algunos con títulos inferiores a 100 UI en la prueba de 2 mercapto-etanol (animales vacunados), presentaron sólo una línea de precipitación muy tenue.

En este trabajo los animales detectados como brucellosos en las pruebas de rutina, fueron confirmados como tales utilizando antígenos solubles en la técnica de CONTRAINMUNOELECTROFORESIS; los resultados obtenidos en la misma tienen la ventaja de ser rápidos y confiables. Siendo factible que esta técnica se perfeccione y pueda reemplazar a las pruebas de rutina.

Diciembre/8/1981.

I N T R O D U C C I O N

La Brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa- que tiende a la cronicidad; en los bovinos es causada en la- mayoría de los casos por Brucella abortus (4,5,18,19,27,41,- 42), afectando principalmente los órganos reproductores, oca- sionando disminución de la fertilidad, aumento en el número- de días abiertos y por lo tanto baja de la producción lác--- tea (4,5,18).

Desde el punto de vista médico veterinario, el sig- no de aborto en el bovino es el más frecuentemente observado (4,15,41). Los animales que han abortado difícilmente lo ha- rán una segunda o tercera vez, pero el problema más grave ra- dica en que estos animales se convierten en portadores del - germen, siendo un foco de infección permanente para hatos -- susceptibles (4,15,18).

Los problemas ocasionados por esta enfermedad moti- varon que en México se creara en el año de 1971 la Campaña - Nacional Contra la Brucelosis, la cual establece las bases - técnicas y prácticas para la prevención, control y erradica- ción de esta enfermedad (15,16,17,18), empleando para ello -

el diagnóstico por pruebas serológicas y la vacunación de --
los animales jóvenes que se someten al programa (15,16,17,18)

La vacunación se realiza en terneras sanas entre -
los 3 y 8 meses de edad por vía subcutánea en la región - --
preescapular. La vacunación precoz tiene la ventaja de elimin
nar los inconvenientes debidos a la presencia de títulos re-
siduales, como sucede en la vacunación a edad más avanzada,-
ya que las inmunoglobulinas producidas al vacunar animales -
adultos interfieren en la interpretación de los resultados -
de las distintas pruebas serológicas, cuando hay necesidad -
de realizarlas (18). Por lo cual, no se recomienda la vacunac
ción en animales mayores de 8 meses ni la vacunación o reva-
cunación en animales adultos (18).

La vacunación induce en los animales que nunca han
tenido contacto con el germen una respuesta primaria, en la-
cual se producen primeramente inmunoglobulinas del tipo M y
posteriormente del tipo G, declinando los títulos de las mism
as en un término de 30 a 45 días (4,18,19,36,41,42). Si a es--
tos animales siendo adultos se les somete a las pruebas que--
indica la CNCB, serán reactores negativos o a lo sumo sospe--
chosos, pero una segunda prueba los confirmará como negati--
vos (16,17,18).

Una segunda exposición al mismo antígeno (revacunación) se caracteriza en los animales por mantener títulos altos residuales de inmunoglobulinas G, que es el tipo de inmunoglobulina predominante en casos de revacunación o infección crónica (4,18,19,36,41,42).

Como no se lleva un control de vacunación en los animales adultos vacunados y/o revacunados, al practicarles pruebas serológicas serán reactores positivos, siendo imposible saber a través de estas pruebas si los anticuerpos detectados fueron producidos por una infección crónica o por una revacunación (15,16,17,18).

Por los problemas que ha ocasionado la Brucelosis en algunas cuencas lecheras del país (Querétaro, Veracruz, Guerrero, Edo. de México, Chalco y Tizayuca), los médicos veterinarios han recurrido a la revacunación múltiple de animales adultos, ocasionando con esta medida serias dificultades en la interpretación de las distintas pruebas de diagnóstico en estos hatos.

Los laboratorios de diagnóstico utilizan las siguientes pruebas serológicas para el diagnóstico de esta zoonosis (1,15,17,18).

1. Aglutinación en placa, prueba rápida y confiable para detectar procesos evolutivos, pero una respuesta negativa no es indicio de ausencia de infección (1,4,5,12,-18).

2. Aglutinación lenta en tubo, es más sensible -- que la anterior. Es la técnica utilizada como referencia en tre estas pruebas serológicas. En lugares en donde la enfer medad es endémica esta prueba detecta títulos bajos de aglu tinación en muchos animales (1,5,12,18).

3.- Aglutinación en tarjeta, es práctica y especí fica, se recomienda aplicarla en hatos grandes, detecta solo reactores positivos, pero se pueden presentar reacciones inespecíficas y obtener falsos positivos en animales sanos- (1,5,12,18,25,31,33,36).

4.- Prueba de 2 mercapto-etanol (2 ME) en la que se inactivan las inmunoglobulinas M y solo se observará la aglutinación causada por las inmunoglobulinas G (1,5,11,12, 18).

Como se observa, el diagnóstico serológico de la Brucelosis plantea varios problemas (10,18,33).

a) Las pruebas serológicas de aglutinación no detectan animales que estén en período de incubación de la enfermedad (10,18).

b) Animales crónicamente infectados muestran respuesta inmune humoral frecuentemente irregular, fluctuando los títulos constantemente en un período determinado (10,--18).

c) Es difícil distinguir títulos de anticuerpos - causados por una infección, de los producidos por la vacunación. En lugares considerados endémicos como México (42), - muchos animales presentan una débil respuesta (10,18).

Para ayudar en el diagnóstico de la Brucelosis, - se han diseñado pruebas complementarias, entre ellas está + la Inmunodifusión en gel de agar (6), que tiene como fundamento el fenómeno de la precipitación (7,20,21,25,29,42). - Existen tres métodos (1,6,20,25,29,42):

1) Precipitación simple: se utiliza desde 1905, - en esta técnica se incorpora el antisuero en el agar y el - antígeno se coloca en pocitos perforados en el gel, el antígeno difunde radialmente alrededor del sitio de aplicación - formando un anillo de precipitación en caso de presentarse-

reacción antígeno-anticuerpo (20,21,25,29,42). Esta técnica es sencilla, se pueden trabajar varias muestras, pero requiere de 24-48 horas de incubación para obtener los resultados (20,21,25,29,42).

II) Precipitación doble: en este procedimiento el antígeno y el antisuero difunden migrando el uno hacia el otro en un gel, formando una línea de precipitación en el lugar en donde los dos se crucen en su trayecto (20,21,25,29,42). La ventaja de esta técnica es que se pueden comparar varios antígenos o antisueros alrededor de un pozo, ya sea de antígeno o antisuero (20,21,25,29,42). Su desventaja es el tiempo empleado para obtener las líneas de precipitación que es de 24-48 horas (21,25,29,42).

III) Inmunoelectroforesis: en esta técnica se hacen migrar las proteínas del suero por medio de un campo eléctrico aplicado sobre un gel de agar, permitiendo una mejor resolución de los componentes antígenos, obteniendo resultados rápidos y confiables (20,21,23,25,29,42).

Una de las técnicas analíticas más recientes aplicadas en el diagnóstico serológico es la CONTRAINMUNOELECTROFORESIS (CIE), que combina la separación previa de antígenos o antisueros mediante la electroforesis y el fenómeno

de la electroendósmosis obteniéndose una magnífica resolución de los complejos antígeno-anticuerpo, siendo una de sus principales ventajas la rapidez en la obtención de los resultados entre 2 y 3 horas (20,21,23,25,29,42).

La CONTRAINMUNOELECTROFORESIS tiene como principio el que un antígeno y un antisuero migren el uno hacia el otro en un campo eléctrico sobre un gel de agar acelerando así la reacción de precipitación (20,21,23,25,29,42). Las variaciones que existen de esta técnica dependen del tipo de antígeno con el que se trabaje, estas variaciones pueden ser: el gel utilizado como medio de sostén, el voltaje aplicado a la prueba, el tiempo de recorrido como del corrido total, el tamaño y distancia entre los pozos, pH y solución amortiguadora utilizada (11,12,22,26,28,34,37,38,39).

Para efectuar las pruebas de Inmunodifusión y CONTRAINMUNOELECTROFORESIS se requiere del empleo de antígenos solubles de B. abortus (ASBA) y antígenos solubles de B. melitensis (ASBM), ambos antígenos son lipopolisacáridos asociados a proteínas en mayor o menor grado (3,5,14,18).

Se han descrito varios procedimientos para obtener los antígenos solubles, estos métodos se diferencian en

tre sí por la cantidad y pureza de los antígenos que proporcionan (2,3,6).

La concepción actual de la estructura antigénica-fundamental de B. abortus y B. melitensis en fase lisa (S) normal, admite la existencia de dos determinantes antigénicos esenciales A y M, presentes en el mismo complejo lipopolisacárido protéico (antígeno "O"), pero en proporción variable según la especie de Brucela de que se trate (3,14,18). Esto teóricamente permite no solo la diferenciación antigénica de B. abortus y de B. melitensis (3,14,18), sino también el reconocimiento de anticuerpos vacunales y anticuerpos infecciosos (3,14,18).

O B J E T I V O S

I. Comparar la CONTRAINMUNOELECTROFORESIS (CIE) - con las pruebas de rutina, como técnica para el diagnóstico de la Brucelosis bovina.

II. Estudiar la utilidad y confiabilidad de los - antígenos solubles de B. abortus (ASBA) y de B. melitensis (ASBM), obtenidos por dos diferentes procedimientos (3,6).

III.- Tratar de diferenciar anticuerpos de animales vacunados de los anticuerpos de animales infectados que previamente fueron reactivos positivos a las pruebas serológicas de rutina, empleando la CONTRAINMUNOELECTROFORESIS -- con antígenos solubles de B. abortus y B. melitensis; estos antígenos son fracciones de Brucela, a diferencia de las -- pruebas de aglutinación que utilizan Brucelas completas como antígeno (3,6,15,16,17).

MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron 765 sueros bovinos, a los cuales se les efectuó las 4 pruebas de aglutinación que marca la CNCB (placa, tubo, tarjeta y 2 mercapto-etanol (2 ME).

Los sueros que fueron reactores positivos en cualquiera de las pruebas antes citadas se trabajaron en la ---CONTRAINMUNOELECTROFORESIS, para que a través de los antígenos solubles fueran detectadas precipitinas, las cuales son características de una infección crónica.

MATERIAL BIOLÓGICO.

Se obtuvieron 765 muestras de sueros bovinos pertenecientes al programa de Rehabilitación de Ganado Crio---llo, de la Subsecretaría de Ganadería, de los que se desconoce su historia clínica, los cuales están localizados en:

- a) Cd. Alemán y Las Choapas, Veracruz.
- b) Sta. Lucía, Chiapas.
- c) Cd. Altamirano, Guerrero.
- d) Lagos de Moreno, Jalisco.

SUEROS TESTIGOS

- 1-A) Positivo a Brucelosis de origen caprino.
- 2-B) Positivo a Brucelosis de origen bovino.
- 3-C) Suero de becerro vacunado.
- 4-D) Negativo a Brucelosis de origen fetal bovino.
- 5-E) Negativo a Brucelosis de origen fetal equino.

Sueros que fueron proporcionados por el Departamento de Virología e Inmunología de la FMVZ. de la UNAM.

ANTIGENOS PARA LAS PRUEBAS DE AGLUTINACION

Los antígenos para las pruebas de aglutinación en placa y tarjeta fueron proporcionados por la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE).

Los antígenos para las pruebas de aglutinación -- lenta en tubo y 2 ME, fueron elaborados con B. abortus cepa 119 que fue proporcionada por el Departamento de Virología e Inmunología de la FMVZ. de la UNAM.

Las pruebas de aglutinación anteriormente mencionadas se realizaron siguiendo los lineamientos de la Campaña Nacional Contra la Brucelosis (CNCB) y el Centro Panamericano de Zoonosis (CEPANZOO) para su ejecución, lectura e interpretación (7,8,17).

ANTIGENOS SOLUBLES ASBA Y ASBM

Se utilizaron cepas de B. abortus lisa y B. meli-
sis rugosa para obtener los antígenos solubles, las cuales -
fueron proporcionadas por el Departamento de Virología e In-
munología de la FMVZ. de la UNAM.

Estas brucelas se trabajaron en botellas de Roux -
con agar infusión papa según la técnica descrita por el Cen-
tro Panamericano de Zoonosis (CEPANZOO) (6,7). Los cultivos-
así obtenidos se trabajaron por dos técnicas diferentes:

Técnica A: Descrita por CEPANZOO (6), combina la -
centrifugación con el calentamiento (80°C/2 horas) y poste--
riormente la dialisis.

Técnica B: De acuerdo a los procedimientos de Ber-
man (3), donde el paquete celular se introduce al autoclave-
(120°C/5 minutos) para hacer estallar a las brucelas y poste-
riormente se centrifuga la suspensión.

Los antígenos así obtenidos se trabajaron en tres-
formas:

a) Sin modificación alguna, tal como se obtuvieron.

- b) Concentrados utilizando polipropilenglicol.
- c) Diluidos, con el objeto de encontrar la concentración óptima para la reacción de precipitación en la CONTRAINMUNOELECTROFORESIS.

CONTRAINMUNOELECTROFORESIS

Esta se realizó siguiendo la técnica de Myers (27) con las siguientes modificaciones:

a) En lugar de usar solución Veronal con pH 8.2 como amortiguador, se utilizó tris-barbital con pH 8.6.

b) Se precorrió primero el antígeno por 15 minutos y se suspendió el paso de la corriente. Se depositó el suero problema y se corrieron ambos por dos horas más.

Se hizo la lectura de la CIE con ayuda de un negatoscopio. Un suero positivo se manifestó por la aparición de una línea de precipitación entre el pozo del antígeno y el pozo del suero, así como un suero negativo por la ausencia de precipitación (11,12,22,26,28,34,37,38,49).

Al concluir el trabajo se compararon y cotejaron los resultados obtenidos en las distintas pruebas.

R E S U L T A D O S

De los 765 sueros estudiados en las pruebas de --- aglutinación, se obtuvieron solo 12 reactores positivos a to das las pruebas, es decir el 1.56%.

Debido al escaso número de sueros positivos se adi cionaron 15 sueros de animales provenientes del programa --- PRODEL, de los que se logró el aislamiento de Brucella spp.- De estos sueros el 100% de ellos fueron reactores positivos- a todas las pruebas de aglutinación.

Los resultados de las pruebas de aglutinación se- expresan en Unidades Internacionales de acuerdo al Patrón In- ternacional del suero Anti B. abortus (PISAB) (18).

El comité de expertos en Brucelosis FAO/OMS, reco- mienda que no se conceda valor diagnóstico a los títulos in- feriores a 100 UI/ml para los animales no vacunados o en es- tado de vacunación desconocido y 200 UI/ml para los animales vacunados (18).

Se utilizó la prueba de 2ME para distinguir los ti

pos de inmunoglobulinas, esto ayuda a reducir el número de reactores positivos cuando se lleva un programa de vacunación, ya que el 2 mercapto-etanol inactiva a las inmunoglobulinas del tipo M y solo se observa la aglutinación causada por las inmunoglobulinas G (1,5,11,12,18). De esta forma un suero vacunal tendrá un título en 2ME aproximadamente de 25 a 50 UI, guardando una relación con su título en lenta en tubo. Un suero infectado su título en 2ME se mantendrá en 200 UI en relación con su título en lenta en tubo (26,-27).

Los resultados obtenidos en este trabajo se anexan en los cuadros No. 1, 2 y 3.

En el cuadro No. 1 correspondiente a los sueros del Programa de Rehabilitación, se aprecia que 5 de ellos son de animales vacunados como lo manifiesta la lectura en 2ME, los cuales también fueron detectados con el antígeno soluble de B. abortus mostrando solo una línea de precipitación.

Seis sueros correspondieron a animales infectados, los cuales con el antígeno soluble de B. melitensis dieron dos líneas de precipitación. De éstos, 3 sueros con título: 1600 UI en lenta en tubo y 200 UI en 2 ME, mostraron su ser-

gunda línea de precipitación más evidente en relación a los otros sueros con títulos de 800 y 400 UI en lenta en tubo.

En el cuadro No. 2 correspondiente a animales de PRODEL de los que se aisló Brucella spp, todos fueron reactivos positivos a una o más pruebas, sus títulos en tubo -- van desde 400 hasta 1600 UI y en 2ME de 200 UI. El antígeno soluble de B. melitensis los detectó con dos líneas de precipitación, la segunda más evidente a medida que aumentaba su título. Estos animales con la CONTRAINMUNOELECTROFORESIS se confirmaron con Brucelosis.

El cuadro No. 3 corresponde a los sueros testigos, donde los positivos por infección natural solo reaccionaron con el antígeno soluble de B. melitensis y el vacunal con el antígeno soluble de B. abortus.

C U A D R O No. 1

RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS PRUEBAS SEROLOGICAS Y EN LA CIE						
Animales pertenecientes al Programa de Rehabilitación de Ganado Criollo						
IDENTIFICACION DEL ANIMAL	TARJETA	PLACA	TUBO	2 ME	CONTRAIMUNOELECTROFORESIS ANTIGENOS SOLUBLES	
					<u>B. abortus</u> l.	<u>B. melitensis</u> r.
* 21-A	+	50	100	25	+	-
55-A	+	200	1600	200	-	+
* 97-A	+	100	200	50	+	-
399-A	+	200	800	200	-	+
12-C	-	25	25	25	-	-
* 20-D	+	100	100	25	+	-
* 26-D	+	50	200	50	+	-
93-D	+	200	1600	200	-	+
93-9-D	+	200	800	200	-	+
95-0-D	+	200	400	200	-	+
96-0-D	+	200	400	50	-	-
* 103-0-D	+	200	1600	200	+	-
141-0-D	+	200	1600	200	-	+
443-D	-	25	25	25	-	-
445-D	-	25	25	25	-	-
20-0-E	-	-	25	25	-	-

*Sueros de animales detectados como vacunados que con el antígeno soluble de B. abortus, mostraron una sola línea de precipitación poco nítida.

C U A D R O No. 2

RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS PRUEBAS SEROLOGICAS Y EN LA CIE						
Animales pertenecientes a PRODEL de los que se logró aislar <u>Brucella</u> spp.						
IDENTIFICACION DEL ANIMAL	TARJETA	PLACA	TUBO	2 ME	CONTRAINMUNOELECTROFORESIS .. ANTIGENOS SOLUBLES	
					<u>B. abortus</u> 1.	<u>B. melitensis</u> P.
31	+	50	400	200	-	+
34	+	100	400	200	-	+
60	+	200	1600	200	+	+
62	+	200	800	200	-	+
63	+	200	400	200	-	+
65	+	200	800	200	-	+
66	+	200	1600	200	+	+
80	+	200	400	200	-	+
110	+	50	400	200	-	+
121	+	200	800	200	-	+
128	+	200	800	200	+	+
244	+	200	400	200	-	+
267	+	200	1600	200	+	+
313	+	200	400	200	-	+
967	+	200	800	200	-	+

Sueros que con el antígeno soluble de B. melitensis, mostraron dos líneas de precipitación.

C U D R O N o . 3

RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS PRUEBAS SEROLOGICAS Y EN LA CIE						
Sueros testigos proporcionados por el Departamento de Virología e Inmunología de la FMVZ de la UNAM.						
IDENTIFICACION DEL ANIMAL	TARJETA	PLACA	TUBO	2 ME	CONTRAIMMUNOELECTROFORESIS ANTIGENOS SOLUBLES	
					<u>B. abortus</u> 1.	<u>B. melitensis</u> 2.
1-A	+	200	1600	200	-	+
2-B	+	200	1600	200	+	+
3-C	+	100	200	50	+	+
4-D	-	-	-	-	-	-
5-E	-	-	-	-	-	-

D I S C U S I O N

La posibilidad de identificar ganado vacunado con B. abortus cepa 19, 45/20 y H38, utilizando el método de Inmunodifusión (13,14,32,33) plantea que el suero de ganado vacunado y libre de infección contenga precipitinas para antígenos específicos de superficie rugosa de Brucela, pero no - para antígenos específicos de superficie lisa (13).

En este trabajo 5 de los 12 sueros pertenecientes al programa de Rehabilitación, fueron reactores positivos a todas las pruebas de aglutinación, presentaron una línea de precipitación difusa y poco perceptible con el antígeno soluble de B. abortus. Dichos sueros pertenecen a animales vacunados como lo demuestra su título en la prueba de 2 mercapto etanol.

De igual forma Díaz (14) observó que utilizando antígeno soluble de B. abortus para detectar ganado vacunado, - se producía una línea de precipitación, pero que era posible la aparición de dos líneas de precipitación para animales infectados naturalmente.

Utilizando el antígeno soluble de B. melitensis - con los sueros reactivos positivos a todas las pruebas (6 - sueros del programa de Rehabilitación y 15 de PRODEL), se - observó la aparición de una doble línea de precipitación, - la más cercana al pozo del suero fue gruesa y nítida y la - segunda más nítida aún. Los sueros que mostraron esta do-- ble línea de precipitación, pertenecen a animales infecta-- dos como lo demuestran sus títulos en tubo y 2 ME.

Resultados similares fueron obtenidos por Díaz -- (14) usando antígeno soluble de B. melitensis (S-LPS) para-- detectar animales infectados naturalmente, los que se mani-- festaron con una doble línea de precipitación en la prueba-- de Inmunodifusión. Siendo el LPS más importante antigénica-- mente en comparación con el Polisacárido (14).

La presencia de dos líneas de precipitación que - se observaron con los sueros de animales infectados obedece a que se han puesto de manifiesto antígenos ocultos (3,14)- que están representados por la segunda línea que es más ob-- via a medida que aumenta el título del suero, resultados -- que coinciden con lo expresado por Berman (3).

Como se aprecia en los resultados de este traba--

jo, el antígeno soluble de B. abortus no dió los resultados esperados, ya que las líneas de precipitación no fueron -- perceptibles en la mayoría de los casos y el resultado en la CONTRAINMUNOELECTROFORESIS se dió como negativo.

Reportes preliminares indican que el Lipopolisacárido (LPS) de B. melitensis migra mucho mejor que el LPS de B. abortus (13).

Experimentos recientes indican que para una mejor migración, es conveniente someter a los antígenos solubles a una extracción sónica corta, con lo cual las proteínas pueden ser casi completamente separadas del complejo -- Lipopolisacárido-protéico (40,43).

La importancia de los Polisacáridos como se observa, es evidente; los estudios estructurales han mostrado -- que dichos polisacáridos contienen restos de monosacáridos- tales como la glucosa, glucosamina, 3-desoxioctulosónico -- (KDO), ramosa y manosa, los cuales son específicos del antígeno "O" cuya naturaleza varía según el serotipo de Brucela (40).

Los Lipopolisacáridos de los diversos serotipos - difieren en su naturaleza por los restos de azúcares en las unidades de repetición terminal, y en los enlaces que existen entre ellos (40). Así mismo las cepas rugosas tienen polisacáridos con estos restos terminales (40), que se pondrán de manifiesto con una línea más de precipitación.

Los resultados muestran que los antígenos obtenidos con la técnica "A", dieron líneas de precipitación casi imperceptible y en forma recta. La línea en forma recta indica que el antígeno tiene un peso molecular y un coeficiente de difusión próximo al de las inmunoglobulinas como lo cita Lesli (25).

Los antígenos solubles de B. abortus y de B. melitensis obtenidos por la técnica "B", en su concentración original precipitaron formando líneas mucho más nítidas y curvadas hacia el pozo del suero. La curvatura de esta línea indica que el antígeno tiene un peso molecular más alto y un coeficiente de difusión más bajo que el de las inmunoglobulinas, según lo menciona Lesli (25).

El antígeno soluble de B. abortus en forma diluida y concentrado no mostró líneas de precipitación. El antí

geno soluble de B. melitensis al diluirlo o concentrarlo -- disminuye su capacidad de migrar y las líneas no eran muy - claras.

Así mismo se encontró en este trabajo que el antigeno soluble de B. melitensis obtenido por la técnica "B" y utilizado en su concentración original, dió lecturas positivas en CONTRAINMUNOELECTROFORESIS con los sueros reactores positivos en la prueba de 2 mercapto-etanol (200 UI o superior), considerados positivos a Brucelosis, ya que provienen de animales infectados naturalmente (26,27).

C O N C L U S I O N E S

1. Los resultados obtenidos con la CONTRAINMUNOELECTROFORESIS tienen la ventaja de ser rápidos y confiables, en comparación con otras pruebas diagnósticas. Tomando en cuenta que esta prueba está en desarrollo.

2. Existe una relación entre los títulos obtenidos de sueros estudiados en la prueba de 2 mercapto-etanol y la presencia de lecturas positivas de los mismos en CONTRAINMUNOELECTROFORESIS. Pudiendo reemplazar esta prueba a las de rutina, ya que es menos laboriosa, más rápida y confiable.

3. En este trabajo la prueba de CONTRAINMUNOELECTROFORESIS demostró ser valiosa como auxiliar en el diagnóstico de la Brucelosis bovina. Confirmando como brucelosos los sueros de animales reactores positivos en la prueba de 2 mercapto-etanol y descartando a los animales vacunados.

4. Se recomienda la estandarización de las técnicas para la preparación de antígenos solubles de B. abortus y B. melitensis, con lo cual se obtendrán resultados uniformes en los lugares en donde se pretenda realizar esta técnica.

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

- 1.- Alton, G.G. and Pietz, D.: Laboratory Techniques in Brucellosis. 2nd. ed. World Health Organization. Geneva Italy. 1975.
- 2.- Baker, P.J. and Wilson, J.B.: Hypoferremia in mice and its application to the bioassay of endotoxin. Journal of Bacteriology. 90 (4): 903-910, (1965).
- 3.- Berman, T.D., Wilson, L.B. and Moreno.: Characterization of B. abortus soluble antigen employed in immunoassay. J. Clin. Microbiol., 11 (4): 355-362, (1980).
- 4.- Bruner, D.W. and Gillespie, J.M.: Hagan's Infection Diseases of Domestic Animal. 7th ed. Cornell University Press Ithaca, N.Y. USA., 1981.
- 5.- Casas, O.R.: Diagnóstico serológico de la brucelosis. Zoonosis. C. Panamericano de Zoonosis. 18: 107-134. Bs. As. Argentina. 1976.
- 6.- Centro Panamericano de Zoonosis.: Técnica de difusión en gel de agar para el diagnóstico de la epididimitis de los carneros por B. ovis y de la Brucelosis canina por B. canis. Nota técnica No. 20, Bs. As. Argentina, 1976.

- 7.- Centro Panamericano de Zoonosis.: Antígenos para pruebas de aglutinación, Brucelosis. Nota técnica No. 3, - Bs. As. Argentina, 1971.
- 8.- Centro Panamericano de Zoonosis.: Técnicas e interpretación de las pruebas de sero aglutinación para el --- diagnóstico de la Brucelosis bovina. Nota técnica No. 2, Bs. As. Argentina, 1968.
- 9.- Corbel, M.J.: Characterization of antibodies active in the rose bengal plate test. Vet. Rec., 22: 484-485, -- (1972).
- 10.- David, G.: The rose bengal test. Vet. Rec., 24: 447---449, (1971).
- 11.- Dea, S., Roy, S. and Begin, M.E.: Counterimmunoelectrophoresis for detection of neonatal calf diarrhea corona virus: Methodology and comparison with electron microscopy. J. Cli. Microbiol., 10 (2): 240-244, (1979).
- 12.- Diaz, R., Maravi-Poma, E. and Rivero, A.: Comparison of counterimmunoelectrophoresis with other serological test in the diagnosis of human brucellosis. Bulletin of the World Health Organization, USA., 53(4):417-424, 1976

- 13.- Diaz, R. and Jones, M.L.: The immuno-diffusion Method for the identification of cattle vaccinated with Brucella abortus strain 45/20. Vet. Rec., 93: 300-302, - (1973)
- 14.- Diaz, R., Garatea, P., Jones, M.L. and Moriyon, I.: Radial immunodiffusion test with a brucella polysaccharide antigen for differentiating infected from vaccinated cattle. J. Clin. Microbiol., 10: 37-41, (1979).
- 15.- Dirección General de Sanidad Animal. Brucelosis, Campaña Nacional Contra la Brucelosis. SAG. Rev. Sanidad Animal., 8 (2) México, 1973.
- 16.- Dirección General de Sanidad Animal. Reglamento para la certificación de hatos de ganado bovino, caprino, ovino y porcino bajo control de la CNCB. SAG., México. 1976.
- 17.- Dirección General de Sanidad Animal. Pruebas serológicas de rutina para el diagnóstico de la Brucelosis. -- Boletín técnico No. 1, México, 1970.
- 18.- FAO/OMS. Comité de Expertos en Brucelosis. Quinto informe. Serie de Informes Técnicos, No. 464. Ginebra, Suiza, 1971

- 19.- Flores, M.L.: Detección de anticuerpos séricos contra -
B. suis en cerdos de abasto por la técnica de ELISA.
Tesis de licenciatura. FMVZ., UNAM. México, D. F. 1981.
- 20.- Fundemberg, H. and Daniel, P.: Manual de Inmunología -
Clínica. 2da. ed. Ed. Manual Moderno. Méx., 1980.
- 21.- Garvey, J., Cremer, N. and Sussdorf, D.: Methods in
immunology. 3rd ed, W. A. Benjamin INC. USA., 1977.
- 22.- Haris, N. and Duncan, C.: Rapid detection and quantita-
tion of Clostridium perfringens enterotoxin by counter-
immuno-electrophoresis. Appl Environ Microbiol., 34 (2)
125-128, (1977).
- 23.- Kulshrestha, R. and Atal, P.: Electrophoresis patterns
of brucella positive human and bovine sera. Indian J.
Medical Research, 60 (6): 809-814, (1972).
- 24.- Lambert, G. and Ameraul, T.: An evaluation of acidified
plate test antigens for detecting bovine brucellosis.
Am. J. Vet. Res , 23: 1031-1033, (1962).
- 25.- Leslie, H. and Frank, C.: Inmunología Práctica. Ed.
Jins Barcelona España, 1979.
- 26.- Muhammed, S. and Mohammedi, H.: A comparison of Coun-
ter-immuno-electrophoresis with the rose bengal and the-

tube agglutination test in the diagnosis of brucellosis in sheep. Vet. Microbiol., 5 (3): 223-228. (1980).

- 27.- Myers, D., Jones, L. and Varela-Diaz, V.: Serological and bacteriological detection of B. canis infection of stray dogs in Moreno, Argentina. Cornell Veterinarian, 70: 258-265, (1980).
- 28.- Myers, D. and Varela-Diaz, V.: Serodiagnosis of ram epididymitis by counter immunoelectrophoresis, using B. ovis surface R antigen. J. Clin. Microbiol., 10 451-453, (1979).
- 29.- Neremberg, S.T.: Electrophoresis. A practical Laboratory manual, F.A. David Company, Philadelphia USA., 1966.
- 30.- Nicoletti, P.,: Utilization of card test in brucellosis eradication J. Am. Vet. Assoc. 151: 1778-1782, (1967).
- 31.- Nicoletti, P.: Further evaluation of serologic test procedure used to diagnosis of brucella. Am. J. Vet. Res 30: 1811-1816, (1969).
- 32.- Nicoletti, P., Lois, M.: Comparison of the subcutaneous and conjuntival route of vaccination with B. abortus strain 19 vaccine in adult cattle. J.A.V.M.A., 173 (11) 1450-1456, (1978).

- 33.- Nicoletti, P., Lois, M.: Adult vaccination with standard and reduced doses, of B. abortus strain 19 vaccine in a dairy herd infected with brucellosis. J.A.V.M.A., 173 (11): 1445-1449, (1978).
- 34.- Niebojewski, R. and Aguilar-Torres, F.: Application of counterimmunoelectrophoresis in rapid detection cytomegalovirus antibodies. A. J. Cli. Pathol., 68 (3): 343-346, (1978).
- 35.- O'Reilly, D. and Cunningham. B.: An assessment of the - brucellosis card test. Vet. Rec., 88: 590-594, (1971).
- 36.- Patterson, M., Deyoe, B. and Ston, S.: Identification of immunoglobulins associates with complement fixation, agglutination and low buffered antigen test for brucellosis. Am. J. Vet. Res., 37: 319-324, (1976).
- 37.- Philpott, M. and Onoviron, O.: The use of counter immunoelectrophoresis in the diagnosis of contagious bovine pleuroneumoniae. J. Comparative Pathology., 89 (3): 301-308, (1979).
- 38.- Poli, G. and Pozza, O.: Application of counter immunoelectrophoresis for a rapid serodiagnosis of enzotic bovine leukosis. Brithis Veterinaru Journal., 136 (3): 251-255, (1980).

- 39.- Rojas-Espinosa, O. and Estrada, P.: Antymycobacterial - antibodies in diffuse lepromatous leprosy detected by - counterimmunoelectrophoresis. Int. J. Lepro., 44 (4): 448-452, (1976)
- 40.- Rose, H.A.: Microbiología química. 1a. ed. Ed. Alhambra Madrid España, 1969.
- 41.- Ruiz, C.: Brucelosis. La Prensa Médica Mexicana. México, 1954.
- 42.- Tizar, I.: Inmunología Veterinaria. 1a. ed. Ed. Interamericana. México, D.F., 1979.
- 43.- Verstrete, R., Creasy, T. and Cavenet, C.: Outer membrane proteins of Brucella abortus: Isolation and characterization. Infect. Immun., 35 (3): 979-989, (1982).