



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

BIBLIOTECA - UNAM

ENCUESTA SEROLOGICA DE BRUCELOSIS
EN OVINOS UTILIZANDO EL METODO DE

E. L. I. S. A.

(Ensayo Inmunoenzimático)

TESIS PROFESIONAL
Que para obtener el título de
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P r e s e n t a
ROBERTO PADILLA NORIEGA

Asesores: M.V.Z. AURORA VELAZQUEZ E.
M.V.Z. MARIA DE JESUS TRON F.
M.V.Z. SALDIVAR ZUÑIGA E.



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.

GUAM
1983
P-357
e.a
P-t-83-123a



El presente trabajo fue realizado en el Departamento de
Inmunología y Virología de la Facultad de Medicina Vete-
raria y Zootecnia de la U.N.A.M.

I N D I C E

	Página.
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
- La brucelosis en ovinos	2
- Respuesta humoral a la infección natural con <u>brucelas</u>	3
- Relación antigénica entre los lipopolisacáridos de las brucelas	3
- Las pruebas de laboratorio para el diagnóstico - de brucelosis en ovinos	5
- La prueba de E.L.I.S.A.	6
- Objetivo del trabajo	6
MATERIAL Y METODOS	7
- Obtención de sueros para la encuesta serológica	7
- Obtención de sueros de ovino negativos a <u>brucelosis</u>	7
- Producción de suero de ovino anti <u>B. melitensis</u>	7
- Producción de suero de conejo anti <u>B. meliten--sis</u>	8

- Obtención del lipopolisacárido (LPS-L) de <u>B. melitensis</u>	9
- Producción de los conjugados con fosfatasa alcalina o Peroxidasa	9
- ELISA indirecto para anticuerpos al antígeno de <u>B. melitensis</u>	12
- Proporción en que se usaron los dos tipos de conjugado	15
RESULTADOS	16
DISCUSION	21
CONCLUSIONES	25
LITERATURA CITADA	26

ENCUESTA SEROLOGICA DE BRUCELOSIS EN OVINOS
UTILIZANDO EL METODO DE E.L.I.S.A.
(ENSAYO INMUNOENZIMATICO)

ROBERTO PADILLA NORIEGA

A S E S O R E S :

MVZ. AURORA VELAZQUEZ E.
MVZ. MA. DE JESUS TRON F.
MVZ. SALDIVAR ZUÑIGA E.

R E S U M E N

Se procesaron 67 sueros de ovino procedentes del Centro Ovino del Programa de Extensión Agropecuaria de la Universidad Nacional Autónoma de México y 68 sueros procedentes del Rastro, para detectar inmunoglobulinas G (IgG) anti B. melitensis con una técnica inmuno-enzimática ---- (ELISA).

De los 135 sueros probados, 134 fueron negativos y - solo 1 suero procedente del Rastro fue positivo. Estos resultados fueron comparados con las pruebas de aglutina---ción rápida en placa, aglutinación lenta en tubo, Coombs y Fijación de complemento. Los sueros negativos a la prueba de ELISA también fueron negativos por estas pruebas, y el suero positivo por ELISA solo lo fue a la prueba de -- Coombs con un título de 1:160. Las dos pruebas, ELISA y - Coombs coinciden en que son capaces de detectar anticuerpos no aglutinantes.

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

LA BRUCELOSIS EN OVINOS

La brucelosis en ovinos ha sido reportada por la infección con Brucella melitensis, Brucella ovis y Brucella abortus (11, 25).

En muchos países se han reportado infecciones esporádicas por B. abortus en rebaños que están en contacto con bovinos infectados, sin que se observe una propagación lateral de un mismo rebaño o de un rebaño a otro (11). Los pocos reportes del aislamiento de ésta especie en ovinos, aún cuando ellos estén expuestos a bovinos infectados, la hace rara y sin significancia enzoótica o epizoótica ---- (25).

La infección por B. ovis sólo se ha encontrado afectando en forma natural a los ovinos, provocando una epididimitis en el carnero (tumefacción y endurecimiento por - lo común unilateral), granulomas en el conducto espermático y lesiones de las tunicas (5, 11, 25). Ocasionalmente se observa mortalidad neonatal (5, 11, 25). En México se describe un brote de epididimitis ovina en el año de ---- 1979, donde se señala que en estudios previos a este brote, sólo se demostró la presencia de ciertos niveles de -

anticuerpos y al parecer de caracter inespecifico, ya que no se observaron animales con manifestaciones clinicas o lesiones macroscopicas sugestivas de la epididimitis causada por B. ovis, ni se aisló el germen (29).

B. melitensis es el agente etiológico caracteristico de la brucelosis ovina y caprina (1). Los caprinos considerados el huésped natural a B. melitensis (25), son más susceptibles que los ovinos a la infección (5, 11), lo -- que explica la brucelosis en ovinos en países donde hay -- gran población de caprinos (25). El aborto es el princi-- pal signo de la enfermedad, pudiendose encontrar osteoartritis, sinovitis, espondilitis, orquitis, etcétera (25, 33).

RESPUESTA HUMORAL A LA INFECCION NATURAL CON BRUCELAS

La infección natural con brucelas va seguida de la -- producción de inmunoglobulinas M (IgM) e inmunoglobulinas G (IgG), posteriormente y sobre todo en los casos cróni-- cos, la clase principal, y muchas veces única, de inmuno-- globulinas es la IgG (11).

RELACION ANTIGENICA ENTRE LOS LIPOPOLISACARIDOS DE LAS -- BRUCELAS

B. abortus y B. melitensis en su forma virulenta na-

tural, forman colonias de morfología lisa (L) en medios - de cultivo (12), de las que se recobran dos fracciones -- con actividad endotóxica, 3 y 5, con el método de extracción fenol-agua caliente de Westphal et al., descrito por Baker y Wilson (4). Químicamente las fracciones 5 de la - fase fenólica de ambas especies de Brucella son complejos lípido-carbohidrato-proteínico ácido 2-3-ceto-deoxioctulo sónico (23), y se les denomina lipopolisacárido (LPS) --- (19), lipopolisacárido liso (LPS-L)(32) o lipopolisacárido liso crudo (no purificado)(26). El LPS-L contiene los dos determinantes antigénicos somáticos esenciales A y M pero en proporción variable según la especie (11) y biotipo (13). B. melitensis y B. abortus muestran reacción cruzada en estos antígenos (7, 11).

Por factores ambientales las colonias de brucelas de morfología L (melitensis y abortus) se disocian para dar lugar a colonias de morfología rugosa (R)(7, 12), paso -- que lleva consigo la pérdida de virulencia y alteración - en la especificidad inmunológica (7). B. ovis sólo forma colonias de morfología R.

A la fecha no existen estudios que determinen la relación antigénica entre el LPS-L de B. melitensis y B. ovis, pero en estudios realizados con el LPS-L de B. abor-

tus y sueros anti B. abortus R, muestran que:

El lipopolisacárido liso purificado (LPS-Lp) de B. a
bortus no reacciona en inmunolectroforesis con suero an-
ti B. abortus R (si no se encuentra reacción cruzada al -
comparar las variantes lisa-rugosa de una sola especie, -
se puede suponer que tampoco la habrá al hacer la compara
ción inter-especies), mientras que el lipopolisacárido li
so crudo (LPS-Lc) si reacciona por contener componentes -
bacterianos contaminantes (26). En la prueba de ELISA no
presenta reacción cruzada, a pesar de utilizar el LPS-Lc,
probablemente porque los contaminantes son removidos por
lavado en el proceso de adsorción del LPS-Lc (21).

LAS PRUEBAS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNOSTICO DE BRUCELO SIS EN OVINOS

Las pruebas que se emplean en el diagnóstico de bru-
celosis en ovinos son: a) aislamiento del germen (11, ---
25), b) pruebas serológicas (aglutinación (11, 25), fija-
ción de complemento (1, 5, 11), precipitación en gel de -
agar (1, 10, 11), inhibición de la hemaglutinación (1), -
prueba de anillo en leche (1, 11), Coombs (1, 11)), c) --
prueba para la determinación de la inmunidad de tipo celu
lar (intradermoreacción)(1, 11, 25). Estas pruebas se han
evaluado y demostrado su utilidad en el diagnóstico de la

brucelosis (1, 10, 11, 20).

LA PRUEBA DE E.L.I.S.A.

La prueba de ELISA (del inglés "Enzyme-linked Immungosorbent Assay") empezó a desarrollarse con los trabajos de Avrameas y Uriel en Francia en 1966 (30) y fue establecido el método para la cuantificación de inmunoglobulinas - por los investigadores suecos Engvall y Perlmann en ---- E.U.A. en 1971 (14, 22, 30, 35), lo que dió origen a un - gran número de trabajos, donde se ha descrito como una -- prueba altamente sensible y específica, de costos relativamente bajos, reactivos estables, de larga vida y seguros en su uso, de rápida interpretación de resultados ya sea visualmente o con equipos especializados, adaptable a equipos automáticos y a trabajos a gran escala (8, 9, 14, 15, 21, 22, 24, 30, 31, 35).

OBJETIVO DEL TRABAJO

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la presencia de IgG anti B. melitensis en ovinos, empleando la técnica de ELISA.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

OBTENCION DE SUEROS PARA LA ENCUESTA SEROLOGICA

Se obtuvieron 135 muestras de suero de ovino. 1) 36 sueros de ovino procedentes del Rastro de Milpa Alta. D. F., 2) 32 sueros de ovino procedentes del Rastro de Ferre~~r~~ía, D. F. y 3) 67 sueros de ovino procedentes de una explotación tecnificada (COPEA, Centro Ovino del Programa - de Extensión Agropecuaria, Topilejo, D. F.).

OBTENCION DE SUEROS DE OVINO NEGATIVOS A BRUCELOSIS

Cinco sueros de ovino (436, 852, 1063, 1375 y 1438) procedentes del COPEA negativos a brucelosis por las --- pruebas de: Aglutinación rápida en placa, aglutinación - lenta en tubo, Coombs y Fijación de complemento, fueron almacenados a - 20 °C hasta su uso.

PRODUCCION DE SUERO DE OVINO ANTI B. melitensis

Se inoculó una oveja clínicamente sana en tres oca-- siones a intervalos de 10 y 30 días, con una suspensión - de B. melitensis cepa 16 M* conteniendo 5×10^7 gérmenes

* Proporcionada por el Depto. de Virología e Inmunología de la Fac. de Med. Vet. y Zoot. de la UNAM.

en un ml. de amortiguador de fosfatos salino -PBS- (-----
NaH₂PO₄ 0.0028 M, Na₂HPO₄ 0.0072 M, NaCl 0.145 M, pH ----
7.2), por vía subcutánea, equivalentes a 100 DI₅₀ (DI = -
dosis infectiva), de acuerdo a lo establecido por el Comi
té mixto FAO/OMS de Expertos en brucelosis (11). La oveja
fue sangrada los días 8, 18, 22, 35, 40 y 49 después del
primer inóculo (día 0), los sueros fueron titulados por -
la prueba de aglutinación rápida en placa y almacenados a
- 20 °C hasta su uso. Se obtuvo también una muestra san--
guínea para hemocultivo (11).

PRODUCCION DE SUERO DE CONEJO ANTI B. melitensis

Un conejo clínicamente sano (2 Kg) fue inmunizado 8
veces consecutivas a intervalos de 1 semana con 1 ml. de
la cepa 16 M de B. melitensis, muerta por calor (65 °C -
una hora (3)). El ml. contenía aproximadamente 10¹¹ célu
las y la primera dosis fue emulsificada con adyuvante --
completo de Freund*. La vía utilizada fue la subcutánea
en diferentes zonas y el conejo fue sangrado una semana
después de la última inoculación. El suero obtenido fue
titulado por la prueba lenta en tubo y almacenado a - 20
°C hasta su uso.

* Difco laboratories, Detroit Michigan, U.S.A.

OBTENCION DEL LIPOPOLISACARIDO (LPS-L) de B. melitensis

La cepa 16 M de B. melitensis se cultivó en frascos de Roux con agar infusión de papa de acuerdo a la técnica descrita por Alton et al. (1). El cultivo se cosechó a -- las 72 horas con Solución Salina Fisiológica -SSF- esté-- ril. Se tomaron unas muestras que fueron sembradas en a gar biotriptasa para pruebas de disociación (1). El cultii vo cosechado se lavó tres veces de acuerdo a Baker y Wil- son (3). A 15 gr. de brucelas sin liofilizar, considera-- das arbitrariamente como 5 gr. de peso seco, se les extraj o la fracción No. 5 de la fase fenólica de acuerdo al mé todo descrito por Baker y Wilson (4). Esta fracción se -- probó en inmunodifusión (16) contra suero de ovino y de - conejo anti B. melitensis, antes de utilizarse en la prueb a de ELISA como antígeno.

PRODUCCION DE LOS CONJUGADOS CON FOSFATASA ALCALINA O PE- ROXIDASA

Se procedió como se indica en los siguientes incisos (A-E)

A. OBTENCION DE GAMMA GLOBULINAS DE OVINO

Se obtuvieron gamma globulinas de ovino, de acuerdo a la técnica descrita por Garvey et al. (16), las que se

examinaron por electroforesis en tiras de acetato de celulosa para determinar su pureza de acuerdo a la técnica -- descrita por Garvey et al. (16).

B. PRODUCCION DE SUERO DE CONEJO ANTI GAMMA GLOBULINA DE OVINO

Una fracción de gamma globulinas se utilizó para la inmunización de dos conejos clínicamente sanos (2 Kg) de acuerdo al protocolo de inmunización para la producción - de anticuerpos anti gamma globulinas, descrito en el Manual de laboratorio, del curso de actualización de inmunología veterinaria (27).

C. PURIFICACION DE IgG DE OVINO

Para la purificación de las IgG de ovino, se pasaron las gamma globulinas de ovino a través de una columna de cromatografía en celulosa dietilaminoetilada, de acuerdo a la técnica descrita por Garvey et al. (16), las que se probaron en inmunolectroforesis para determinar su pureza (16, 28).

D. PURIFICACION DE INMUNOGLOBULINAS DE CONEJO ANTI IgG DE OVINO

250 mg. de IgG de ovino fueron insolubilizadas con -

glutaraldehído, para utilizarse como inmunoadsorbente en la obtención de inmunoglobulinas de conejo anti IgG de ovino, de acuerdo a la técnica descrita por Avrameas y Ternynck (2, 34) las que se probaron en inmunolectroforesis para determinar su pureza (16, 28).

E. CONJUGACION

a) Con Fosfatasa Alcalina* (FA)

Las inmunoglobulinas de conejo anti IgG de ovino se conjugaron con FA por el método del glutaraldehído de un paso, de acuerdo a la técnica descrita por Voller et al. (35). Con la siguiente modificación: Se emplearon 0.88 -- mg. de FA tipo VII con una actividad enzimática de 1000 U + 4.12 mg. de FA tipo I con una actividad enzimática de - 1.3 U/mg., en lugar de utilizar 5 mg. de FA tipo VII con una actividad enzimática de 1000 U/ml.

b) Con Peroxidasa** (PO)

Las inmunoglobulinas de conejo anti IgG de ovino se conjugaron con PO por el método del glutaraldehído de dos

* Sigma Chemical Co. St. Louis Missouri, U.S.A.

** Reanl Budapest, Hungary.

pasos, de acuerdo a la técnica descrita por Voller et al. (35), donde se empleó PO de rábano picante (RZ = 1), con una actividad enzimática de 280 U/mg. por el método de o-dianisidina, en lugar de emplear PO de rábano picante (RZ = 3).

ELISA INDIRECTO PARA ANTICUERPOS AL ANTIGENO DE B. meli-- tensis

Para el ensayo de ELISA se decidió adaptar el método indirecto de Voller et al. (35), incluyendo un paso extra de incubación con suero de ave. El procedimiento consiste en los siguientes pasos:

1. Adsorción del antígeno (LPS-L)

Ciento cincuenta microgramos del antígeno fueron diluidos por cada ml. de amortiguador carbonato/bicarbonato (Na_2CO_3 0.015 M, NaHCO_3 0.035 M, pH 9.6) y añadido en cantidades de 200 microlitros por pozo en filas por duplicado y una fila control sin antígeno en una placa de poliestireno*. La placa fue incubada toda la noche a 4 °C en una caja húmeda, para permitir al antígeno adsorberse a la superficie plástica. La placa fue lavada por vaciamien

* Dynatech Laboratories Virginia, U.S.A.

to, llenando con PBS Tween (NaCl 0.137 M, KH_2PO_4 1.47 mM, Na_2HPO_4 0.013 M, KCl 2.68 mM, Tween 20 0.5 ml./litro, pH 7.4), este procedimiento fue repetido tres veces y las -- placas fueron entonces secadas por sacudimiento.

2. Adición de suero de ave

El suero de ave fue diluido 1/20 en PBS Tween y añadido en cantidades de 200 microlitros a cada pozo. La placa fue incubada 3 horas a temperatura ambiente en una caja húmeda y luego lavada como se describió anteriormente.

3. Adición del suero problema

Los sueros fueron diluidos 1/50 en PBS Tween y cantidades de 200 microlitros fueron añadidos a los pozos, dos con antígeno y uno sin antígeno. La placa fue incubada 2 horas a temperatura ambiente en una caja húmeda, luego la vada seis veces como se describió anteriormente.

4. Adición del conjugado

Docientos microlitros del conjugado diluido (1/200 pa ra FA y 1/40 para PO) recientemente en PBS Tween fueron añadidos a cada pozo e incubado 3 horas a temperatura am-- biente, después de lo cual las placas fueron lavadas.

5. Adición del substrato

Docientos microlitros de la solución del sustrato - (p-nitrofenilfosfato para el conjugado de FA, diluido en amortiguador dietanolamina al 10 % (dietanolamina 97 ml., H₂O destilada 800 ml., NaN₃ 3.076 mM, MgCl₂ 0.49 mM, pH - 9.8 ajustado con HCl 1 M) y orto-fenilenediamina para el conjugado de PO, diluido en amortiguador fosfato-citrato (ácido cítrico 0.1 M, Na₂HPO₄ 0.2 M + 40 microlitros de - H₂O₂ al 30 %) fue añadido a cada pozo. El momento en que se hizo la adición fue cuidadosamente anotado.

6. Frenado de la reacción

Después del tiempo de incubación (25 minutos), la -- reacción fue detenida (frenada) con la adición de 50 mi-- crolitros de la solución de frenado (NaOH 3 N para el p-- nitrofenilfosfato y H₂SO₄ 2.5 M para o-fenilenediamina).

7. Lectura de la reacción

La cantidad de hidrólisis del sustrato, que corres-- ponde a la cantidad de anticuerpos "específicos" presen-- tes en el suero problema (paso 2) se manifiesta por un -- cambio de coloración, la que se leyó mediante la aprecia-- ción visual y/o a 405 nm para el p-nitrofenilfosfato y a 492 nm para la o-fenilenediamina, en un espectrofotóme--- tro.

PROPORCION EN QUE SE USARON LOS DOS TIPOS DE CONJUGADO

De los 135 sueros problema, 16 sueros procedentes -- del Rastro fueron probados con el conjugado de PO y los - 119 restantes con el conjugado de FA.

R E S U L T A D O S

De los 135 sueros probados para detectar IgG anti B. melitensis, 134 fueron negativos (cuadro 1, 2 y 3) y solo 1 suero procedente del Rastro fue positivo por la prueba de ELISA (cuadro 2). Estos resultados fueron complementados con otras pruebas serológicas: Aglutinación rápida en placa, aglutinación lenta en tubo, Coombs y Fijación de complemento (cuadro 4 y 5). Con estas pruebas se encontraron bajos títulos en algunos sueros del COPEA, los cuales son considerados negativos (1, 11, 25), y el suero positivo en la prueba de ELISA, solo lo fué a la prueba de ---- Coombs con un título de 1/160 (cuadro 5).

Los sueros de la oveja inoculada y titulados por la prueba de aglutinación rápida en placa (ver material y métodos), presentaron títulos de 1/25, 1/50, 1/100 y 1/200 (--- figura 1) y se encontraron positivos en la prueba de ---- ELISA tanto con el conjugado de FA como con el conjugado de PO (cuadro 1 y 3).

C U A D R O No. 1
 RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRUEBA DE ELISA*
 SUEROS PROCEDENTES DEL COPEA

No. DE SUERO	ELISA
Los 67 sueros	(-)
Oveja inoculada	(+)
* Con conjugado de Fosfatasa alcalina	

C U A D R O No. 2
 RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRUEBA DE ELISA**
 SUEROS PROCEDENTES DEL RASTRO

No. DE SUERO	ELISA
1-8	(-)
9	(+)
10-52	(-)
** Con conjugado de Fosfatasa alcalina	

C U A D R O No. 3
 RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRUEBA DE ELISA*
 SUEROS PROCEDENTES DEL RASTRO

No. DE SUERO	ELISA
53-68	(-)
Oveja inoculada	(+)

* Con conjugado de Peroxidasa

C U A D R O No. 4
 RESULTADOS OBTENIDOS CON OTRAS PRUEBAS SEROLOGICA
 SUEROS PROCEDENTES DEL COPEA

No. DE SUERO	PLACA	TUBO	COOMBS	F C'
Los 67 sueros	(-)	(-)	(-)	(-)

C U A D R O No. 5
 RESULTADOS OBTENIDOS CON OTRAS PRUEBAS SEROLOGICAS
 SUEROS PROCEDENTES DEL RASTRO

No. DE SUERO	PLACA	TUBO	COOMBS	F C'
1-8	(-)	(-)	(-)	(-)
9	(-)	(-)	1/160	anticomplementario
10-52	(-)	(-)	(-)	(-)

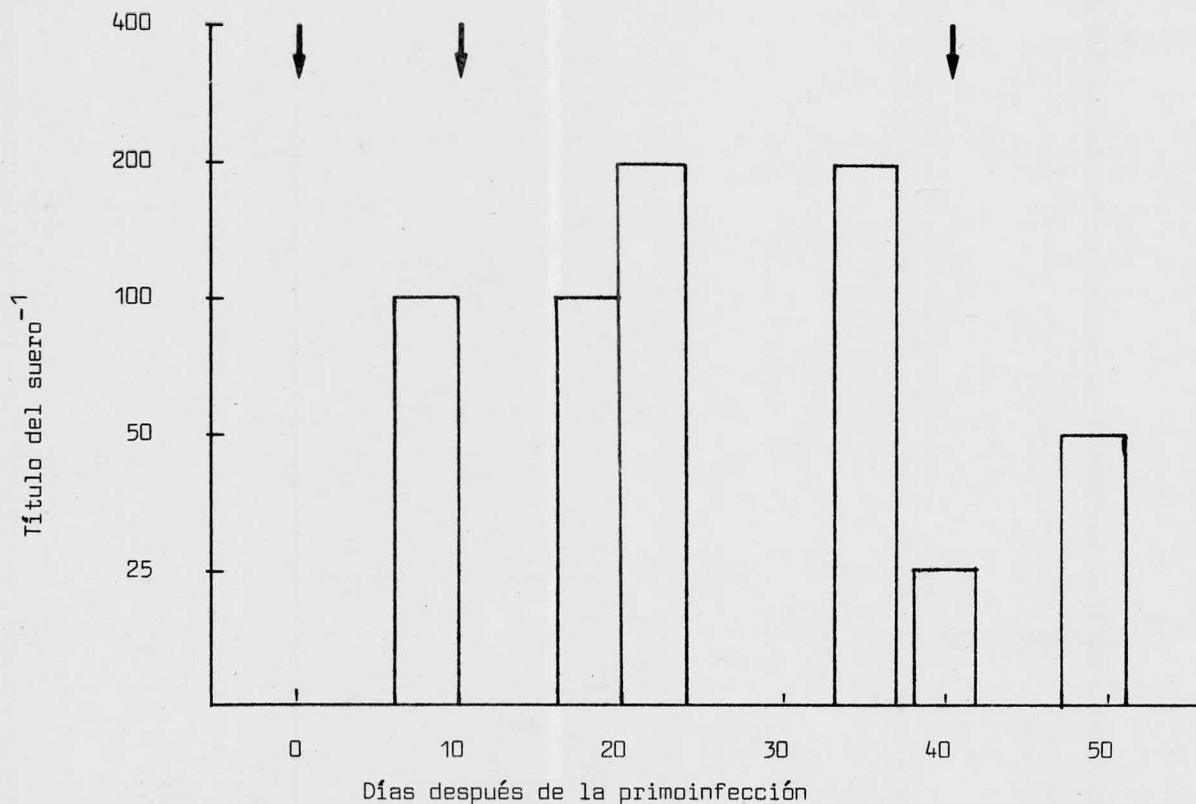


Figura No. 1. Titulación por aglutinación rápida en placa del suero de una oveja triplemente inoculada con B. melitensis. Se inmunizó con 100 dosis infectantes 50 % en tres ocasiones (indicadas por las flechas) y se tituló el suero obtenido a diferentes tiempos después de la primoinfección.

D I S C U S I O N

De los 67 sueros probados del COPEA, todos resultaron negativos a la prueba de ELISA (cuadro 1), por lo que es conveniente señalar que en este centro desde su creación (1979) ha introducido animales negativos a brucelosis por pruebas de aglutinación, pruebas que se llevan a cabo en casos de abortos u orquitis para descartar la posibilidad de brucelosis ya que son los principales signos de la enfermedad (11, 25). Al complementar los resultados obtenidos por la prueba de ELISA con otras pruebas serológicas, se encontraron bajos títulos en algunos sueros, -- que en el caso de sueros negativos corresponden a títulos por reacciones cruzadas en casos de vacunación o infección con algunas cepas de Vibrio (Campilobacter), Pasteurella, Salmonella o Yersinia (1). Por esta razón se manejan distintos umbrales, dependiendo de la prueba empleada y de si el rebaño ha estado expuesto o no (11, 25). Lo anterior corrobora que la prueba de ELISA es mas específica gracias al uso de antígeno purificado.

La baja frecuencia de seroreactores positivos, 1.47 % de los sueros procedentes del Rastro (cuadro 2), concuerda con la baja incidencia reportada de Brucella spp. en ovinos en México (5). Por otro lado, las condiciones -

de explotación de ovinos en México, en que es frecuente - la convivencia estrecha con bovinos y caprinos, sugería - una mayor incidencia de infección con B. abortus y B. melitensis que la encontrada con una prueba altamente sensible como ELISA.

Resulta interesante el hecho de que el único suero - positivo por la prueba de ELISA (cuadro 2) se encontró negativo a las pruebas de aglutinación rápida en placa y aglutinación lenta en tubo (cuadro 5), pero positivo a la prueba de Coombs, lo que sugiere la presencia de anticuerpos no aglutinantes, presentes en los casos crónicos y detectables solo por la prueba de la antiglobulina (prueba de Coombs)(1).

CONSIDERACIONES SOBRE LA PRUEBA

Para el revestimiento eficiente de las placas con el LPS-L de B. melitensis fue necesario usar una cantidad muchas veces mayor que el reportado para el LPS de B. abortus (9, 21). Carlsson (9) empleando el LPS de B. abortus, LPS de Y. enterocolitica y LPS de S. typhi encontró diferencias similares en el revestimiento eficiente de las -- placas y plantea como explicación la diferencia en solubilidad de las preparaciones de LPS, dada por un contenido mayor de lípidos en el LPS de B. abortus, lo que afecta -

el enlace que presumiblemente es a través de interacciones hidrófobas.

Se observó una tendencia de las IgG (que son las que se detectaron) a fijarse en forma inespecífica a las placas, lo que coincide con lo señalado por otros autores (17, 35). Una forma de eliminar este problema es utilizar una proteína adicional, por lo que aquí se decidió emplear suero de ave, tomando la precaución de poner controles de este suero con suero positivo de referencia, ya que hay reportes de que las aves pueden contraer la brucelosis (1). Pero hay que hacer notar que no todos los sueros presentan el mismo grado de fijación inespecífica a la placa, por lo que fue necesario el empleo de los controles sin antígeno por suero probado, dado que solo se consideran positivos aquellos sueros que presentan una clara diferencia en coloración al comparar los pozos con y sin antígeno.

Debido a que en este trabajo se empleó una mezcla de fosfatasa alcalina con distinta actividad enzimática (ver material y métodos) fue necesario usar una concentración relativamente alta del conjugado para obtener una buena sensibilidad.

El empleo de PO con un RZ (Reinheitszahl) diferente (ver material y métodos) no afectó la prueba. Dado que la diferencia entre ambas PO es principalmente el contenido de hemina (Sigma Chemical Co. St. Louis Missouri, U.S.A.) y esto no parece ser una variable importante para la prueba.

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

Los resultados obtenidos indican que la prueba de -- ELISA es apropiada para el diagnóstico de brucelosis en o vinos, ya que se confirmaron en este caso las ventajas -- que esta técnica presenta sobre las pruebas de aglutina-- ción rápida en placa, aglutinación lenta en tubo y Fija-- ción de complemento en cuanto a sensibilidad y especificii dad.

L I T E R A T U R A C I T A D A

1. Alton, G. G., Jones, L. M. y Pietz, D. E.: Las técnicas de laboratorios en la brucelosis. Organización Mundial de la Salud. Gine--bra, Suiza, 1976.
2. Avrameas, S. y Ternynck, T.: The cross-linking of proteins with -glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoadsor----bents. Immunochemistry, 6: 53-66 (1969).
3. Baker, P. J. y Wilson, J. B.: Chemical composition and biological properties of the endotoxin of Brucella abortus. J. Bacteriol., -90: 895-902 (1965).
4. Baker, P. J. y Wilson, J. B.: Hypoferremia in mice and its appli--cation to the bioassay of endotoxin. J. Bacteriol., 90: 903-910 - (1965).
5. Blood, D. C. y Henderson, J. A.: Medicina Veterinaria. 3a. ed. -- Ed. Interamericana, pp. 387-404, México, 4, D. F., 1976.
6. Boletín Zoonosanitario. Subsecretaría de Ganadería. Dirección Gene--ral de Sanidad Animal de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. México, 1979, 1980 y 1981.
7. Burrows, W. y Freeman, B. A.: Textbook of Microbiology. 21th ed. Saunders, pp. 571-581, Philadelphia, U.S.A., 1979.

8. Byrd, J. W., Heck, F. C. e Hidalgo, R. J.: Evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay for detecting Brucella abortus antibodies. Am. J. Vet. Res., 40: 896-898 (1979).
9. Carlsson, H. E., Hurvell, B. y Lindberg, A. A.: Enzyme-linked immunosorbent assay (elisa) for titration of antibodies against Brucella abortus and Yersinia enterocolitica. Acta Path. Microbiol. Scand., 84 (sect. C): 168-176 (1976).
10. Centro Panamericano de Zoonosis. OPS/OMS. 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.
11. Comité mixto FAO/OMS de Expertos en Brucelosis. Quinto informe. - Serie de informes técnicos, No. 464. Ginebra, Suiza, 1971.
12. Davis, B. S., Dulbecco, R., Eisen, H. N., Ginsberg, H. S., Wood, W. B. y Mc Carty, M.: Microbiology. 2nd. ed., Harper & Row, Maryland, U.S.A., 1973.
13. Diaz, R., Jones, L. M., Leong, D. y Wilson, J. B.: Surface antigens of smooth Brucellae. J. Bacteriol., 96: 893-901 (1968).
14. Engvall, E. y Perlmann, P.: Enzyme-linked immunosorbent assay --- (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry, 8: 871-874 (1971).

15. Flores, M. L. E.: Detección de anticuerpos séricos contra Bruce--
lla suis en cerdos de abasto por la técnica de elisa. Tesis de --
licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autó
noma de México. México, D. F., 1981.
16. Garvey, J. S., Cremer, N. E. y Sussdorf, D. H.: Methods in Immuno
logy. 3rd. ed. W. A. Benjamin, INC., U.S.A., 1977.
17. Gravell, M., Dorsett, P. H.: Detection of antibody to Rubella vi
rus by enzyme-linked immunosorbent assay. J. Infect. Dis., 136 (-
supplement): S300-S303 (1977).
18. Hurvell, B.: Serological cross-reactions between different Bruce--
lla species and Yersinia enterocolitica. Immunodiffusion and immu
noelectrophoresis. Acta Vet. Scand., 13: 472-483 (1972).
19. Hurvell, B. y Lindberg, A. A.: Serological cross-reactions bet---
ween different Brucella species and Yersinia enterocolitica type
IX. Acta Path. Microbiol. Scand., 81 (sect. B): 113-119 (1973).
20. Iturbe, R. R.: Evaluación de las pruebas de Coombs e Immunofluo--
rescencia indirecta como métodos de diagnóstico de la brucelosis
porcina. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Univer
sidad Nacional Autónoma de México. México, D. F., 1978.
21. Lamb, V. L., Jones, L. M., Schurig, G. G. y Berman, D. T.: Enzyme
linked immunosorbent assay for bovine immunoglobulin subclass-spe

- cific response to Brucella abortus lipopolysaccharides. Infect. - Immun., 26: 240-247 (1979).
22. Lancet editorial.: ELISA a replacement for radioimmunoassay ?. -- Lancet, 2: 406-407 (1976).
23. Leong, D., Diaz, R., Milner, K., Rudbach, J. y Wilson, J. B.: Some structural and biological properties of Brucella endotoxin. Infect. Immun., 1: 174-182 (1970).
24. Magee, J. T.: An enzyme-labelled immunosorbent assay for Brucella abortus antibodies. J. Med. Microbiol., 13: 167-172 (1980).
25. Marsh, H.: Newsom's sheep diseases. 3rd. ed. Robert, E. Krieger - Publishing Company Huntington, New York, 1973.
26. Moreno, E., Pitt, M. W., Jones, L. M., Schurig, G. G. y Berman, - D. T.: Purification and characterization of smooth and rough lipopolysaccharides from Brucella abortus. J. Bacteriol., 138: 361---369 (1979).
27. Morilla, G. A., Vega, M. C. y Arriaga, M. C. (coordinación): Manual de laboratorio, curso de actualización de inmunología veterinaria. Curso llevado a cabo en el Inst. Nac. de Inv. Pec. de la - Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Impreso en los talleres gráficos de Guadarrama. México, D. F., 1979.

28. Nerenberg, S. T.: Electrophoresis. A practical laboratory manual. F. A. Davis Company, Philadelphia, U.S.A., 1966.
29. Pérez, E., Flores, C. R., Higuera, J. A. y Trigo, T. F. J.: Diagnóstico y descripción de un brote de epididimitis ovina en México originado por Brucella ovis. Vet. Méx., 10: 221-226 (1979).
30. Sánchez, V. J. M. y Cambra, A. M.: Técnicas inmunoenzimáticas en Patología animal y vegetal. Colección de monografías del Inst. -- Nac. de Inv. Agr., No. 29. Madrid, España, 1981.
31. Saunders, G. C., Clinard, E. H., Bartlett, M. L. y Sanders, W. -- M.: Application of the indirect enzyme-labeled antibody microtest to the detection and surveillance of animal diseases. J. Infect. Dis., 136 (supplement): S258-S266 (1977).
32. Schurig, G. G., Jones, L. M., Speth, S. L. y Berman, D. T.: Antibody response to antigens distinct from smooth lipopolysaccharide complex in Brucella infection. Infect. Immun., 21: 994-1002 ----- (1978).
33. Smith, H. A., Jones, T. C. y Hunt, R. D.: Veterinary Pathology. - 4th. ed. Lea & Febiger, Philadelphia, U.S.A., 1972.
34. Ternynck, T. y Avrameas, S.: Polymerization and immobilization of proteins using ethylchloroformate and glutaraldehyde. Scand. J. Immunol., 19 (suppl. 3): 29-35 (1975).

35. Voller, A., Bidwell, D. E. y Bartlett, A.: The enzyme linked immu
nosorbent assay (ELISA). Dynatech Laboratories, INC. London, En--
gland, 1979.

**ESTE TRABAJO SE IMPRIMIO EN LOS TALLERES
GRAFICOS DE GUADARRAMA IMPRESORES, S. A.
AV. CUAUHEMOC 1201, COL. VERTIZ NARVARTE
MEXICO 13, D. F. TEL. 559 22 77 CON TRES LINEAS**



