

68 Zijem.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DETECCION DE ANTIGUERPOS SERICOS CONTRA
Brucella suis **EN CERDOS DE ABASTO**
POR LA TECNICA DE ELISA

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A

LEOPOLDO EDUARDO FLORES MANCILLA

Asesor: M. V. Z. AURORA VELAZQUEZ ECHEGARAY

MEXICO, D. F.

1 9 8 1



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

I.-	Resumen -----	Pág. 1
II.-	Introducción-----	Pág. 2
III.-	Material y Métodos-----	Pág. 11
IV.-	Resultados-----	Pág. 24
V.-	Discusión-----	Pág. 31
VI.-	Conclusiones-----	Pág. 34
VII.-	Bibliografía-----	Pág. 35

I. RESUMEN

Se empleó la técnica de Ensayo Inmunoenzimático Específico (ELISA), para la detección de inmunoglobulinas G contra Brucella suis, en 17 sueros de cerdos, que fueron seleccionados de un estudio, en el cual se efectuaron y evaluaron las técnicas de: Coombs, Aglutinación Lenta en Tubo y Factor Inhibidor de la Migración de los Macrófagos (MIF).

La técnica ELISA se estandarizó con un antígeno soluble de Brucella suis (utilizado como detector), y las primeras cinco muestras sericas de cerdos a quienes se les aisló la bacteria del mismo género y especie, los títulos de IgG fueron variables (1:400 - 1:12,800). Se repitió la prueba a cada uno de éstos sueros en tres días diferentes y por quintuplicado en un día, los títulos detectados la primera ocasión se reprodujeron en un 88%, cifra representativa de buena reproducibilidad, para aceptar a ésta técnica como prueba serológica.

Los 12 sueros restantes que habían resultado negativos por las técnicas de Coombs y Aglutinación Lenta en Tubo, se diagnosticaron por la técnica ELISA (estandarizada), detectando 7 positivos y 5 negativos.

II. INTRODUCCION

La Brucelosis es una entidad nosológica, infectocontagiosa, clasificada como una zoonosis de distribución mundial y de implicaciones epidemiológicas importantes (1,3,5,10,12,18).

Es causada por bacterias del género Brucella, del que se han identificado 6 especies: Brucella abortus (1897), Brucella mellitensis (1920), Brucella suis (1929), Brucella ovis -- (1956), Brucella neotomae (1957) y Brucella canis (1968), (18, 36)

Afecta a los animales domésticos como: bovinos, equinos, suinos, caprinos y ovinos, en cuyas explotaciones origina pérdidas económicas y conjuntamente problemas de salud pública (1,3,5,12,18,36).

En los cerdos los principales signos que produce la enfermedad son: abortos, momificaciones de los fetos, parálisis posterior, orquitis unilateral o bilateral, infertilidad y disminución de la libido, la cual es común en los sementales ---- (5,11,13).

Frecuentemente en las explotaciones porcinas el único signo observado es el elevado porcentaje de cerdas que presentan esto a los 30 ó 45 días después de la monta (5).

Las alteraciones patológicas observadas en los cerdos reproductores a la necropsia consisten en: inflamación de los -

testículos con granulomas múltiples en el parénquima, epidídimo y próstata (5,6), en las cerdas se han observado granulomas de naturaleza miliar en la mucosa vaginal y uterina (5), la placenta se encuentra hiperémica y edematosa, los fetos suelen aparecer con hemorragias subcutáneas y fluido peritoneal (5,13,15).

Histopatológicamente se distinguen gran cantidad de células reticuloendoteliales y en ocasiones células gigantes, hiperplasia del tejido intersticial, necrosis coagulativa, necrosis caseosa con descamación de epitelios, los ganglios presentan colecciones focales de macrófagos, proliferación difusa del epitelio reticular, las membranas fetales contienen exudado fibrinopurulento con granulomas de 2 a 3 milímetros de diámetro y que contienen histiocitos, células epiteliales y linfocitos (5,13,15,25). En los testículos existe necrosis y descamación de células espermatogénicas e hiperplasia del tejido conectivo. Las alteraciones en la próstata, glándulas bulbouretrales y epidídimo son aglomeración de linfocitos, la inflamación se extiende por los intersticios de las vesículas seminales, produciendo exudado purulento en los ductos, los espermatozoides son anormales y se produce espermafagocitosis por las células gigantes (12,13,18,25,31).

Para la comprobación del diagnóstico clínico de Bruceosis en los cerdos, se recurre principalmente a 2 métodos:

- 1).- El bacteriológico, se considera el más seguro y consiste en: El aislamiento e identificación del germen Brucella suis, que presenta las si---

guientes características; bacteria de forma coco bacilar mide de 0.5 a 0.7 micras por 0.6 a 1.5, - se encuentra sola o formando cadenas cortas, no móvil, no forma esporas, posee una capa delgada sobre la membrana citoplasmática que posiblemente funcione como cápsula, no toma coloración bipolar, es quimioorganotrófo, y solamente algunos biotipos requieren atmósfera de dióxido de carbono para su crecimiento (1,6,13,18).

- 2).- Pruebas de seroaglutinación, son los métodos comúnmente utilizados en la comprobación del diagnóstico clínico, de éstas las que se utilizan en forma constante y rutinaria son:

Prueba de Aglutinación en Placa, es confiable en la detección de procesos evolutivos por lo que - su uso está muy difundido, sin embargo una reacción negativa no es concluyente de la ausencia - de infección (1,5,8,24,36).

Prueba de Aglutinación Lenta en Tubo, utilizada debido a que posee una sensibilidad mayor que la anterior en la detección de procesos evolutivos, es la técnica utilizada como referencia y como - medida de comparación entre las pruebas de seroaglutinación, no obstante en animales con débil respuesta inmunológica es frecuente observar --

reacciones falsas negativas (1,5,24,36).

Prueba de Aglutinación en Tarjeta, es sencilla - en su realización y se recomienda para aplicarse a sueros de porcinos cuyo número sea elevado, -- puesto que solamente detecta reacciones positi-- vas, sin embargo se pueden presentar reacciones inespecíficas (1,5,8,18,24).

Existen otro tipo de pruebas llamadas complementarias y que se caracterizan por ser más sensibles y disminuir las -- reacciones inespecíficas, las recomendadas en la detección de -- cerdos sospechosos de padecer Brucelosis son:

Prueba Europea de Aglutinación en Tubo, la cual aumenta su sensibilidad en relación a las prue-- bas patrón en tubo, puesto que el suero se dilu-- ye aún más, sin embargo no está exenta de reac-- ciones heteroespecíficas (1,18,24).

Prueba de Antígeno Amortiguado Brucelar (AAB), - la cual emplea un antígeno teñido que contiene - 8% de bacterias por volumen, se considera positi-- va cuando presenta aglutinación en cualquier gra-- do y negativa en ausencia de la reacción (1,24).

Prueba de Mercaptoetanol, en la que se inactivan las inmunoglobulinas M del suero y detecta la -- aglutinación producida por las inmunoglobulinas G (1,3,8,24).

Prueba de Fijación del Complemento, es la prueba de elección para el diagnóstico de esta zoonosis, y se utiliza principalmente en los bovinos. Existen 2 variantes; la fijación en frío (0 - 4°C.) - durante 14 - 18 horas, o a 37°C. durante 30 minutos, el Patrón Internacional del Suero Anti-Brucella abortus (PISAb), es tomado como base para establecer los títulos de diagnóstico, sin embargo en los porcinos se ha limitado su utilización debido a que los sueros de esta especie son pro-complementarios (1,12,24).

Prueba de Coombs, utiliza una antigammaglobulina específica contra determinado tipo de anticuerpo, se considera de alta sensibilidad en la detección de anticuerpos no aglutinantes, se ha utilizado en encuestas epidemiológicas, puesto que detecta títulos bajos de difícil interpretación (1,18,24).

Prueba del Factor Inhibidor de la Migración de - (MIF), se considera de alta sensibilidad en la - evaluación de la inmunidad de tipo celular, ha - demostrado ser eficaz en la detección de cerdos con procesos crónicos de Brucelosis (40).

Todas las pruebas citadas se han utilizado y evaluado en diversas partes del mundo, debido al aumento de casos de seres humanos que son diagnosticados como afectados de Brucelosis

y a los trastornos económicos que la enfermedad produce en las explotaciones de cerdos (8,10,19,20,35).

En Argentina (1975), se utilizó la prueba de Aglutinación en Placa, para el diagnóstico de 3,389 cerdos de exposiciones regionales, de los cuales se encontraron 14.3% de reactores positivos (34). En el mismo año en Formosa (China Nacionalista), se empleó la prueba de Aglutinación en Tarjeta para diagnosticar a 2,295 cerdos y 83 cerdas, se encontraron 2.7% de positivos en los cerdos y 8% en las cerdas (34).

Posteriormente (1978) en Tamil Nadu (localidad de la India) se utilizó la prueba de Aglutinación en Tarjeta en el diagnóstico de 1,103 cerdos, de los cuales 40 a 80% fue positivo (32). En el mismo año se atraparon 95 jabalíes en una región de la Florida (Estados Unidos), los sueros de estos animales se probaron por las técnicas de Aglutinación en Tarjeta, Fijación del Complemento y Rivanol, encontrando 51 reactores positivos - por lo menos a una de las cuatro pruebas empleadas, y en 9 animales se aisló Brucella suis (3).

En la República Mexicana se utilizan frecuentemente - las técnicas de: Aglutinación en Tarjeta, Aglutinación en Placa y Aglutinación Lenta en Tubo, para diagnosticar Brucelosis - en los porcinos, estas pruebas son aplicadas en la Campaña Nacional Contra la Brucelosis (CNCB), creada en el año de 1971 -- con el objeto de implementar la lucha contra la enfermedad y establecer su control, la información proporcionada por esta campaña con respecto a la especie suina, se resume en el cuadro 1.

Cuadro No. 1 .- Situación de la Brucelosis Porcina en México según datos que aparecen en circulares mensuales de la Campaña Nacional Contra la Brucelosis .

1	2	3	4	5	6	7
1970	*	*	*	*	*	*
1971	*	*	*	*	*	*
1972	131/219	7	5.3	0/2	0	-
1973	718/2612	11	1.5	1/13	262	-
1974	1547/5723	19	1.2	4/23	486	-
1975	1671/6124	22	1.3	5/29	615	-
1976	1682/6315	23	1.3	5/26	630	-
1977	1678/6506	28	1.6	5/25	653	-
1978	1888/6712	31	1.6	5/31	615	4
1979	1890/7702	35	1.6	6/35	620	4
1980	*	*	*	*	*	*

1.- Año

2.- Animales muestreados/animales control

3.- Positivos a una ó mas pruebas empleadas por la C.N.C.B.

4.- Prevalencia

5.- Hatos libres/número de hatos

6.- Animales amparados con certificado de hato libre

7.- Revalidaciones

*.- No hay datos disponibles de ésta información

En los resultados descritos anteriormente, se tomaron como base las pruebas de seroaglutinación que se utilizan en forma convencional (14), no obstante se ha demostrado que la baja eficacia de éstas, se debe principalmente a las reacciones heteroespecíficas y títulos de difícil interpretación que se presentan frecuentemente (24).

Sabemos que la Brucelosis produce generalmente una infección crónica y por ende la respuesta inmune del cerdo contra Brucella suis es de base celular, sin embargo las pruebas serológicas mencionadas anteriormente evalúan la inmunidad humoral, la cual en ocasiones presenta dificultad en su interpretación, puesto que pueden existir bajas cantidades de anticuerpos aglutinantes, o altas cantidades de IgG bloqueadoras que interfieren el poder aglutinante e impiden que se manifieste un resultado positivo (1,8,18,24).

A pesar de que no existe una técnica que detecte el 100% de los cerdos infectados, los hechos anteriormente mencionados, han motivado la búsqueda de técnicas que superen a las convencionales con mayor eficiencia (9,24,33,40), una de éstas es la técnica de ELISA (Enzyme-Linked-Immunesorbent-Assay), desarrollada por Avrameas, quien en 1969 logró por primera vez el acoplamiento de una enzima a un anticuerpo (1). La técnica se utilizó en un principio para detectar gammaglobulinas G en el suero de conejo, los resultados obtenidos fueron prácticamente iguales a los demostrados con la técnica de Radioinmunoensayo (17), posteriormente en 1973 la ELISA se utilizó para detectar

toxina de Vibrio Cholerae con resultados similares (25), fue -- hasta el año de 1976 cuando se aplicó la ELISA en la detección de anticuerpos contra Brucella abortus, mostrando una mayor -- sensibilidad en relación a las pruebas de seroaglutinación (9), posteriormente en 1978, la misma técnica se utilizó para diag-- nosticar bovinos infectados por Brucella abortus, con resulta-- dos similares a los mencionados en cuanto a sensibilidad (7). - En 1979 Lamb y Col. concluyeron que la técnica de ELISA además de ser altamente sensible es específica, puesto que en un estu-- dio realizado con sueros de bovinos infectados por Brucella -- abortus, se diferenció claramente las reacciones de antigenici-- dad cruzada que éstos tenían con lípopolizacaridos de bacterias como: Yersinia enterocolitica - 0 tipo V, Escherichia coli y - Pseudomonas solanacearum (29).

Se ha despertado interés por el uso de la ELISA, y en la actualidad es utilizada en la detección de seres humanos -- afectados por Brucelosis, los resultados iniciales de estos es-- tudios revelaron que la técnica es más sensible que las pruebas de Coombs y Fijación del Complemento (33).

El objetivo del presente trabajo fue: estudiar e im-- plementar la técnica de ELISA, para el diagnóstico de la Bruce-- losis porcina, su utilización en combinación con las pruebas de aglutinación que actualmente se usan para el diagnóstico de es-- ta zoonosis, y que nos ayude a interpretar la gran cantidad de reacciones inespecíficas que se observan con éstas.

III. MATERIAL Y METODOS

1.- Muestras de sueros controles y sospechosos.

De un estudio* realizado en 100 cerdos de la Granja Experimental Porcina de la Universidad Nacional Autónoma de México, y de los que resultaron 22% positivos a Brucelosis; se seleccionaron 17 sueros que presentaban las características -- que a continuación se describen:

5 sueros que pertenecieron a muestras sanguíneas, cuyos paquetes de glóbulos blancos resultaron positivos mediante la técnica de MIF, estos sueros resultaron negativos por las técnicas de Aglutinación Lenta en Tubo y Coombs, sin embargo a los animales que pertenecían estas muestras, se les aisló *Brucella suis* en la necropsia, por lo que los respectivos sueros se utilizaron como controles positivos.

7 sueros que pertenecieron a muestras sanguíneas, cuyos paquetes de glóbulos blancos resultaron negativos mediante la técnica de MIF, estos sueros presentaron títulos de anticuerpos de difícil in

* La Prueba de MIF para el diagnóstico de la Brucelosis porcina (40).

interpretación pero se consideraron negativos al emplear las técnicas de Aglutinación Lenta en Tubo y Coombs.

5 sueros que pertenecían a muestras sanguíneas, cuyos paquetes de glóbulos blancos resultaron negativos mediante la técnica de MIF, estos sueros resultaron negativos mediante las técnicas de Aglutinación Lenta en Tubo y Coombs, las cuales no presentaron títulos de anticuerpos contra Brucella suis.

2.- Suero de conejo dirigido contra la fracción IgG del suero de cerdo.

Para la elaboración de este producto fue necesario seguir el proceso que a continuación se describe:

A) Obtención de gammaglobulinas de cerdos.

Se colectó sangre de varios cerdos clínicamente sanos, la cual se tomó en forma aséptica al momento del degüello en frascos estériles, se dejó en reposo para la retracción del coágulo y posteriormente fue centrifugada a 8,000 x G x 10 minutos, se obtuvo el suero correspondiente, el cual se almacenó a -20°C. hasta su uso.

El suero obtenido se fraccionó empleando el método descrito por Larghi (11), luego la solución -

de gammaglobulinas resultante se resuspendió en 25 mililitros de agua tridestilada y posteriormente se le determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry. (32).

- B) Obtención del suero de conejo dirigido contra -- las gammaglobulinas del suero de cerdo (suero hipérimune).

Con las gammaglobulinas de cerdo que se obtuvieron en el paso anterior; se inoculó un conejo -- clínicamente sano (peso de 2 kg), con 1.5 miligramos de gammaglobulinas emulsificadas en adyuvante completo de Freud*, por vía intradérmica -- en los cojinetes plantares la operación se repitió a los 7, 14, 28, 35 y 42 días emulsificando en estas ocasiones con adyuvante incompleto de -- Freud, al término del período el animal fue sangrado por punción cardíaca y de la sangre se extrajo el suero correspondiente.

La acción biológica del antisuero obtenido se verificó por los métodos de Inmunolectroforesis, -- Inmunodifusión simple y la prueba de Ouchterlony (19,26,27,41).

* GIBCO, Labs., U.S.A.

C) Separación e identificación de las gammaglobulinas A, M y G del suero de cerdo.

La separación se realizó por Cromatografía de Columna**, la preparación de la resina soporte -- (DEAE-Celulosa), el empaque de la misma y la -- filtración de las gammaglobulinas se llevó a cabo empleando los métodos descritos por Endressen (19) y Kaltreider (30).

La identificación de cada una de las colecciones obtenidas en la cromatografía se realizó por los métodos de: Inmunolectroforesis, Inmunodifusión simple e Inmunodifusión Radial en placas comerciales***, y la prueba de Ouchterlony, se determinó la fracción que contenía únicamente gammaglobulinas G de cerdo y posteriormente se le -- cuantificó la concentración de proteínas por el método de Lowry.

** Pharmacia Fines Chem., Sweden, (5 x 28 cm).

*** Immunoplates, Hyland Travenol Labs., U.S.A.

- D) Obtención del suero de conejo dirigido contra la fracción IgG del suero de cerdo.

Una vez obtenida la fracción IgG del suero de cerdo; a dos conejos clínicamente sanos y con peso promedio de 1,800 gramos cada uno, se les programaron series de inoculaciones con diferentes calendarios, en forma simultánea, uno se inoculó con 1 miligramo de gammaglobulinas G de cerdo emulsificadas en adyuvante completo de Freud, y aplicando por vía intradérmica en los cojinetes plantares, el procedimiento se repitió a los 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días, al otro conejo se le varió el calendario de inoculaciones las cuales se efectuaron a los 15, 30 y 45 días, posteriormente a los dos conejos se les realizó el sangrado por punción cardíaca, separando el suero correspondiente y almacenándolo a -20°C. hasta su utilización.

3.- Antígeno Soluble de Brucella suis (BSSA).

Para la extracción de este antígeno se realizaron modificaciones al método original de extracción del BASA (Brucella abortus soluble antigen), propuesto por Berman y Wilson (4), y que a continuación se describen:

A) Cultivo:

Con una cepa de Brucella suis*, se realizó la --
siembra de bacterias en un tubo de ensayo que --
contenía medio de crecimiento (Agar Trypticasa -
Soya), se incubó durante 72 horas a 37°C., poste-
riormente el cultivo se cosechó con solución sa-
lina bufferada pH 6.4, con el producto obtenido
se repitió la siembra en un frasco de Roux que -
contenía el medio de Agar Infusión Patata (1), -
luego se incubó y al obtener la semilla de bacte-
rias se inoculó 1 ml en cada frasco de Roux has-
ta completar 18, se incubaron todos a 37°C. du-
rante 72 horas y al final se lavó el cultivo de
cada frasco con 15 ml de solución salina buffera-
da por cada uno, las suspensiones bacterianas que
se obtuvieron fueron centrifugadas a 10,000 x G
x 10 minutos conservando la temperatura en 4°C.,
este procedimiento se repitió con el objeto de -
lavar el paquete de bacterias en tres ocasiones
con agua tridestilada, posteriormente se resus-
pendió en una solución de sacarosa 0.44 M. y clo-
ruro de magnesio 0.03 M., la suspensión obtenida
se colocó en un fraccionador RIBI-Sorvall**, y -

* Donada por el Departamento de Inmunología y Virología,
FMVZ U.N.A.M.

**Chicago Inc., U.S.A.

se le aplicó una presión de 11,350 Kg x 2.54 cm² (25,000 libras por pulgada cuadrada), en el proceso de ruptura las bacterias se pasaron a través del fraccionador en 3 ocasiones, con el objeto de asegurar la destrucción total de las bacterias.

B) Extracción del antígeno BSSA.

El producto fraccionado se centrifugó a 25,000 x G x 10 minutos, después se eliminó el precipitado y el sobrenadante se envasó en forma estéril, este producto se almacenó durante su utilización a -20°C.

C) Cuantificación de proteínas en el antígeno BSSA.

Al antígeno obtenido se le determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry.

4.- Implementación de la técnica ELISA

A la técnica original descrita por Engvall y Perlman (17), se le realizaron las modificaciones -- que a continuación se describen:

A) Sensibilización del medio soporte.

Se utilizó un lote de placas de microtitulación*

* Microtiter plates, Cookes Engineering Co., U.S.A.

las cuales fueron sensibilizadas con antígeno soluble de Brucella suis (BSSA), del que se depositaron 170 microgramos en todos y cada uno de los pozos destinados a las diferentes diluciones de los sueros, posteriormente las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas y después a 4°C. durante 20 horas, realizando este -- procedimiento en atmósfera húmeda. El objetivo de este paso fue unir el antígeno al poliestireno de la placa, cubriendo el fondo de cada uno de los pozos.

B) Aplicación del suero problema:

A todas las placas se les eliminó el antígeno -- que no se adhirió al poliestireno, puesto que se lavaron en tres ocasiones con una solución de -- PBS-Tween-20 0.005% (solución lavadora), posteriormente las placas se dejaron secar a temperatura ambiente. Cada suero se diluyó por separado -- 1:25 utilizando como diluyente PBS-Tween 20 albúmina 0.05% pH 7.4 (solución amortiguadora), se -- agregaron 100 microlitos de la solución anterior a todos y cada uno de los pozos a excepción de -- los controles, después a cada hilera de pozos -- destinada a los sueros, se les agregó (únicamente al primer pozo de cada hilera) 100 microlitos de la dilución 1:25 hecha previamente, realizan-

do series de diluciones dobles hasta la dilución 1:12,800, cada muestra se efectuó por duplicado, posteriormente las placas se incubaron a 37°C. - en atmósfera húmeda durante 120 minutos. El objeto del presente paso fue: unir los anticuerpos dirigidos contra Brucella suis, a el antígeno pegado en las placas (en el caso de sueros positivos).

C) Aplicación de gammaglobulinas de conejo dirigidas contra la fracción IgG del suero de cerdo.

Se repitió el método de lavado y secado descrito anteriormente, después se agregaron a cada uno de los pozos; 100 microlitos de una solución de gammaglobulinas de conejo y dirigidas contra la fracción IgG del suero de cerdo, éstas se diluyeron 1:200 en solución amortiguadora, posteriormente las placas se incubaron a 37°C. en atmósfera húmeda durante 120 minutos.

El objetivo del proceso descrito fue permitir la unión de la anti-IgG de conejo a los anticuerpos IgG del suero de cerdo, los cuales previamente se unieron al antígeno colocado en las placas -- (en el caso de sueros positivos).

- D) Aplicación de gammaglobulinas de cabra (conjugadas con una enzima) dirigidas contra las gammaglobulinas G del suero de conejo.

Las placas se lavaron y secaron como antes, después se adicionaron 100 microlitros a cada uno de los pozos, de una solución de gammaglobulinas de cabra*, que estaban dirigidas contra la fracción IgG del suero de conejo, éstas se diluyeron 1:500 con solución amortiguadora y se aplicaron, después las placas se incubaron a 37°C. en atmósfera húmeda durante 60 minutos.

En este paso se logra la unión de las gammaglobulinas G de cabra (conjugado) con las gammaglobulinas G de conejo, las cuales se unieron previamente al complejo formado y que se describe en los pasos B y C.

- E) Aplicación de substrato cromogénico.

Se repitió el método de lavado y secado, luego se agregaron a cada uno de los pozos; 100 microlitos de substrato cromogénico, el cual se dilu-

* Alkaline Phosphatase Conj. Anti Rabbit IgG (goat), Miles Labs, U.S.A.

yó en amortiguador de Dietanolamina al 10% pH -- 9.8 (41), las placas fueron entonces incubadas a 37°C. en atmósfera húmeda durante 30 minutos.

En este paso se logra que al añadir el sustrato cromogénico se produce el desdoblamiento de la enzima presente en los anticuerpos IgG de cabra y que se unieron a los anticuerpos de conejo, la reacción se manifiesta por un producto colorido (amarillento), el cual es proporcional a la cantidad de IgG de conejo presentes en el complejo, y las cuales a su vez identifican a los anticuerpos IgG del suero de cerdo, que a su vez se adherieron al antígeno colocado en las placas de poliestireno, en el caso de sueros negativos la técnica no muestra coloración.

F) Aplicación de Hidróxido de sodio.

Se adicionaron 50 microlitos de una solución de hidróxido de sodio 3 M., a todos y cada uno de los pozos, con el objeto de detener la reacción enzimática y proceder a la interpretación.

** (p-Nitrofenil-Fosfato), SIGMA, Chem., U.S.A.

G) Controles.

A todas y cada una de las placas se les incluyeron los siguientes controles:

- I). Control de suero negativo, pozo sensibilizado con antígeno BSSA y al que se añadió 100 microlitos de un suero negativo, posteriormente se agregó el complejo descrito en los pasos C, D y E, realizando los procesos de lavado y secado entre cada paso, no se debe observar reacción (coloración).
- II). Control de anticuerpos marcadores (anti-IgG de conejo contra IgG de cerdo).
Pozo sensibilizado con antígeno y al que se añadieron 100 microlitos de una solución de anticuerpos marcadores (maniobra realizada en el paso C), posteriormente se añade el complejo descrito en los pasos D, E y F, no se observa reacción.
- III). Control de anticuerpos de cabra marcados con una enzima (conjugado). Pozo sensibilizado con antígeno, al que se añadieron 100 microlitos de conjugado, -- después de los respectivos procesos de lavado y secado se le añadieron 100 microlitos de sustrato, se agregó después la solución del paso F y no mostró reacción.

IV). Control de sustrato, pozo sensibilizado con antígeno y al que se agregó el complejo producido en los pasos B, C, D y E, añadiéndole después la solución del paso F, no se observó reacción.

V). Control de albúmina (solución amortiguadora).

Pozo sin sensibilización de antígeno y al que se agregó el complejo producido en los pasos B, C, D y E, añadiéndole después la solución del paso F, no se observó reacción.

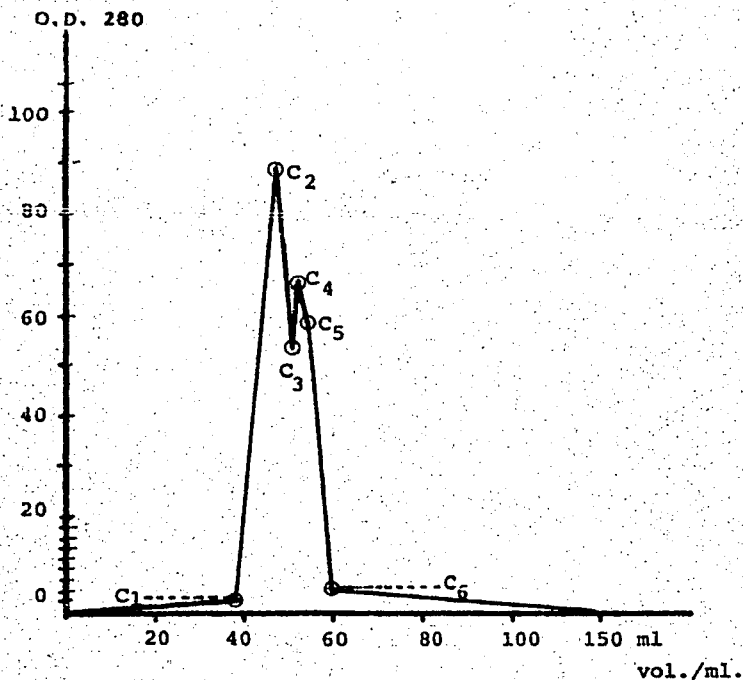
IV. RESULTADOS.

Mediante la técnica de ELISA, se detectaron anticuerpos IgG dirigidos contra Brucella suis en 12 de los 17 sueros probados.

Cuando se realizó la estandarización de la técnica, se utilizaron los primeros 5 sueros mencionados en el punto número 1, los cuales se consideraron como controles positivos, -- los títulos de anticuerpos que se detectaron en éstos, variaron de 1:400 a 1:12,800. Estos resultados se reprodujeron en 88% -- al repetirles la ELISA en tres días diferentes, obteniendo una variación de 12.2%. A los mismos sueros se les realizó la técnica en 5 ocasiones durante 1 día, los títulos que se obtuvieron fueron iguales y con ellos se realizó el análisis de varianza de Friedman, obteniendo estadísticamente $\chi^2 = 1.3$, valor que nos reveló una probabilidad $P < 0.69$, cuyo valor no es significativo.

Cuando se aplicó la técnica de ELISA (estandarizada), a los 12 sueros restantes cuyas características se describen en el punto número 1; los títulos de anticuerpos IgG detectados var rieron de 0 a 1:6,400 resultando 7 positivos y 5 negativos.

GRAFICA No. 1



Separación de gammaglobulinas séricas de cerdo por cromatografía DEAE Celulosa-intercambio aniónico.

C₁.- Fracción IgG (Identificada por Inmunodifusión-radial).

C₂.- Fracción IgG.

C₃.- Fracciones IgG e IgM.

C₄.- Fracciones IgM e IgA.

C₅.- Fracciones IgM e IgA.

C₆.- N. I.

N.I. No identificada.

FIGURA # 1

DETECCION DE ANTICUERPOS SERICOS DE CERDO CONTRA BRUCELLA SUIS POR ELISA.



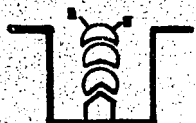
ANTIGENO DE BRUCELLA SUIS (BASA)



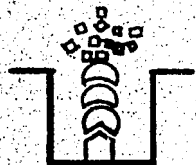
SUERO DE CERDO SOSPECHOSO.



GAMAGLOBULINA DE CONEJO DIRIGIDA CONTRA
LA IgG DE CERDO.



GAMAGLOBULINA DE CABRA DIRIGIDA CONTRA
LA IgG DE CONEJO. (CONJUGADA)



SUBSTRATO.

CUADRO No. 2

ANTICUERPOS SERICOS CONTRA Brucella suis.
EN CERDOS DE ABASTO POR LA TECNICA DE ELISA.

No. SUERO *	TITULOS POR QUINTUPLICADO.				
	1	2	3	4	5
13	1:6400	1:6400	1:6400	1:3200	1:6400
33	1:6400	1:6400	1:12800	1:6400	1:6400
412	1:3200	1:1600	1:1600	1:3200	1:6400
430	1:1600	1:1600	1:1600	1:3200	1:6400
836	1:1600	1:1600	1:1600	1:1600	1: 400
MEDIA					
GEOMETRICA	1:3198	1:2784	1:4848	1:3198	1:3674

* CON AISLAMIENTO DE BRUCELLA Y MIF POSITIVO.

VARIACION INTRAENSAYO $\chi^2_r = 1.3$

p = 0.69

CUADRO No. 3

TITULOS DE ANTICUERPOS CONTRA Brucella suis
EN CERDOS DE ABASTO POR LA TECNICA DE ELISA

No. SUERO*	TITULOS DE ANTICUERPOS EN DIAS DIFERENTES		
	1	2	3
288	1: 3,200	1: 3,200	1: 6,400
923	1: 6,400	1: 6,400	1: 12,800
494	1: 3,200	1: 3,200	1: 1,600
964	1: 1,600	1: 800	1: 800
419	1: 800	1: 800	1: 1,600
30	1: 800	1: 800	1: 1,600
32	1: 400	1: 400	1: 200
480	1: 400	1: 400	1: 200
1	1: 400	1: 400	1: 400
917	1: 200	1: 400	1: 400
474	NEG.	NEG.	NEG.
929	1: 1,600	1: 1,600	1: 800
MEDIA			
GEMETRICA	1: 1,583	1: 1,533	1: 2,233

* SIN AISLAMIENTO Y NEGATIVOS POR COOMBS Y AGLUTINACION LENTA EN TUBO.

CUADRO No. 3

TITULOS DE ANTICUERPOS CONTRA Brucella suis
EN CERDOS DE ABASTO POR LA TECNICA DE ELISA

No. SUERO*	TITULOS DE ANTICUERPOS EN DIAS DIFERENTES		
	1	2	3
288	1: 3,200	1: 3,200	1: 6,400
923	1: 6,400	1: 6,400	1: 12,800
494	1: 3,200	1: 3,200	1: 1,600
964	1: 1,600	1: 800	1: 800
419	1: 800	1: 800	1: 1,600
30	1: 800	1: 800	1: 1,600
32	1: 400	1: 400	1: 200
480	1: 400	1: 400	1: 200
1	1: 400	1: 400	1: 400
917	1: 200	1: 400	1: 400
474	NEG.	NEG.	NEG.
929	1: 1,600	1: 1,600	1: 800
MEDIA			
GEMETRICA	1: 1,583	1: 1,533	1: 2,233

* SIN AISLAMIENTO Y NEGATIVOS POR COOMBS Y AGLUTINACION LENTA EN TUBO.

CUADRO No. 4

TITULOS DE ANTICUERPOS DETECTADOS POR ELISA
COMPARADOS CON OTRAS TECNICAS SEROLOGICAS.

No. suero	A. Lenta en Tubo.	Coombs	MIF	ELISA
*412	1:20(-)	1:40(-)	+	1:6,400 (+)
*430	(-)	(-)	+	1:1,600 (+)
* 13	(-)	(-)	+	1:6,400 (+)
*836	(-)	(-)	+	1:1,600 (+)
* 33	(-)	(-)	+	1:6,400 (+)
923	(-)	(-)	-	1:12,800(+)
288	1:100(-)	(-)	-	1:6,400 (+)
494	1:25(-)	1:25(-)	-	1:3,200 (+)
30	(-)	1:25(-)	-	1:1,600 (+)
929	(-)	(-)	-	1:1,600 (+)
964	1:25(-)	(-)	-	1:800 (+)
419	(-)	(-)	-	1:800 (+)
480	1:20(-)	1:40(-)	-	1:400 (-)
1	(-)	(-)	-	1:400 (-)
32	1:20(-)	1:20(-)	-	1:400 (-)
917	1:20(-)	1:20(-)	-	1:400 (-)
474	(-)	(-)	-	0 (-)

*Con
Aislamiento
de Brucella suis

V. DISCUSION.

Los resultados del presente demuestran que la técnica ELISA es altamente sensible en la detección de gammaglobulinas G del suero de cerdos infectados por Brucella suis, --- puesto que detectó 12 sueros positivos de los 17 probados.

Al estandarizar la técnica se observó que los títulos de IgG en los 5 sueros controles positivos variaron de -- 1:400 a 1:12,300, cuando se repitió la prueba a cada uno de -- éstos sueros en tres días diferentes, los títulos detectados -- la primera ocasión se reprodujeron en un 88%, cifra representativa de buena reproducibilidad (21), para aceptar a ésta -- técnica como prueba serológica.

No obstante al analizar cada paso de la técnica, de bido a la variación presentada en los títulos, se descubrie-- ron los factores que probablemente disminuyeron la reproduci-- bilidad, uno de ellos fué la determinación ocular de los títu -- los en los sueros probados, puesto que la concepción visual -- puede variar de un día a otro, y por lo tanto el título que -- se determinó en un día varió al interpretarse en otro, cuando -- las lecturas se realizan con un fotocolorímetro* especialmen -- te diseñado para ésta técnica, los títulos obtenidos se deter -- minan con exactitud y por ende son de 90 a 100% reproducibles.

* Titertek Multiskan, Flow Labs., Helsinki, Finland.

Otro factor considerado fué la naturaleza cruda del antígeno utilizado (BSSA), debido a que es una mezcla de cuatro elementos (4), lo cual ocasionó que la cantidad despositada en cada uno de los pozos fuera variable, colocando en ocasiones más cantidad en unos y menos en otros sin embargo se logró estandarizar el mencionado antígeno, puesto que la variación originada por éste factor permaneció constante - - - ($X^2 = 1.3$) de acuerdo con el análisis estadístico de Friedman y que señala una probabilidad ($P < 0.69$) cuyo valor no se considerara significativo.

Cuando la técnica ELISA ya estandarizada se utilizó en el diagnóstico de los 12 sueros restantes, los títulos de IgG detectados variaron de 0 a 1: 12,800, el análisis estadísticos de éstos nos mostró una media ($X = 1: 1,583$) que como grupo está por abajo de la obtenida en los 5 sueros controles positivos ($X = 1: 3,200$), éstos resultados nos indican que la técnica descrita diferenció como grupo a los sueros positivos de los negativos, no obstante haber obtenido sueros con títulos altos como el 923 (1: 12,800), y los 288, 494, 30 y 929, los cuales resultaron negativos por las técnicas de Coombs y Aglutinación Lenta en Tubo, éstos títulos probablemente se debieron a que se iniciaba la infección en el animal y/o existía una cantidad baja de anticuerpos que solo fue detectado por la ELISA. Estos resultados son similares a los obtenidos por Magge (33), cuando la utilizó en el diagnóstico de humanos afectados de Brucelosis.

De acuerdo con el análisis de los resultados, se estableció un título sugerente de infección por Brucella suis, - el cual se obtuvo cuando se consideró el título más bajo de - los obtenidos en los 5 sueros controles positivos (1: 1,600), y que debido a la variación de la técnica, se estimó una dilución por abajo de éste, como margen para considerar a los positivos (1: 800) , por lo tanto los sueros que estaban marcados con los números: 923, 288, 494, 30, 929, 964, y 419 - - mostraron títulos de IgG que estuvieron dentro del rango mencionado (positivos).

Los títulos de 1: 400 o menores se consideraron como negativos, puesto que éstos pudieron deberse a reacciones de - antigenicidad cruzada que Brucella suis tiene con otras bacterias como: Yersinia enterocolitica (principalmente en la - fracción Lipopolisacárido) (23), Escherichia coli y Pseudomonas solanacearum (29), quienes infectan con bastante frecuencia a los cerdos (12,15). O a la propia variación de la - técnica, los sueros marcados con los números; 480, 1, 32, 917, y 474 resultaron negativos.

VI. CONCLUSIONES.

1.- La técnica de ELISA demostró alta sensibilidad, al detectar la presencia de anticuerpos IgG contra Brucella suis, en muestras séricas de cerdos que se habían diagnosticado por otras técnicas.

2.- La ELISA no presentó dificultades técnicas en su implementación, así como en la estandarización de ésta para el diagnóstico de la Brucelosis porcina.

3.- El análisis estadístico demostró: que los resultados obtenidos en cada uno de los sueros probados mediante la técnica de ELISA, fueron 88% reproducibles, y que solo variaron en un 11.2%, valores que la hacen una técnica serológica adecuada y que puede ser utilizada en la detección de cerdos afectados de Brucelosis.

4.- Se detectaron mediante la ELISA, 12 sueros positivos a Brucelosis y 5 negativos.

5.- Es imperativo ampliar los estudios sobre la técnica ELISA, que se implementó para el diagnóstico de Brucelosis porcina; empleando mayor número de animales (población sana y enferma), con el objeto de establecer con precisión, los títulos diagnósticos de enfermedad en los cerdos.

VII. BIBLIOGRAFIA.

1. Alton, G. G., Jones, L. M. y Pietz, D. E.: Las Técnicas de Laboratorio en la Brucelosis. 2a. ed. Organización Mundial de la Salud. Ginebra (1976).
2. Avrameas, S. : Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde use of conjugate for detection of antigens and antibodies. Immunochemistry, 6: 43-52 (1969).
3. Becker, H.N., Belden, R. C., Breault, T., Burridge, M. J., Frankenbergen, W. B. y Nocoletti, P.: Brucellosis in Feral swine in Florida. J.A.V.M.A., 173 (9): 1181-1182 (1978).
4. Berman, T.D., Bambi, L. W., Moreno, E., Angus, D.R. y Jones, M. L.: Characterization of Bruce-lla abortus Soluble Antigen Employed in -- Immunoassay. Journal of Clin. Microbiol., 11 (4): -- -- 355-362 (1980).
5. Bilby, S. W.: Swine Brucellosis in Oklahoma. Oklahoma Veterinary Medicine Ass., XXVII - (3): 104-105 (1975).

6. Brune, D. W., Gillespie, J. H. y Hagan, S.: Infectious Diseases of Domestic Animals. -- 6th.ed. Cornell University Press, Ithaca, N. Y. 215, U.S.A. (1973).
7. Byrd, H. N., Heck, F. C., e Hidalgo, R. J. : Evaluation of Enzyme-Linked-Immunesorbent-- Assay for detecting Brucella Abortus antibodies.
Am. J. Vet. Res., 40 (6): (1979).
8. Casas, O. R.: Diagnóstico serológico de la Brucelosis. Zoonosis. Centro Panamericano de -- Zoonosis. 18: 107-134 B. A. Argentina -- (1976).
9. Carlsson, H. E., Hurvell, B., y Lindberg, A. A.: - Enzyme - Linked - Immunesorbent-Assay -- (ELISA) for Titration of antibodies - -- against Brucella abortus and Yersinia enterocolitica. Acta Pathol. Microbiol.- Scand. Sec. C, 84: 168-176 (1976).
10. Center for Disease Control Brucellosis Surveillance Annual Summary. 1977. U.S. Department of Health Education and Welfare.

11. Centro Panamericano de Zoonosis: Prueba de Anticuerpos Fluorescentes para Rabia. Of. Sanitaria Panamericana, nota técnica No. 3, B.A. Argentina (1975).
12. Deyoe, B. L.: Immunology and Public Health significance of Swine Brucellosis. J.A.V.M.A., - 160 (4) 640-643 (1972).
13. Deyoe, B. L.: Pathogenesis of Three Strains of Brucella suis in Swine. Am J. Vet. Res., 28 (125): 951-957 (1967).
14. Dirección General de Sanidad Animal. Situación de la Campaña Nacional Contra la Brucelosis. Circulares mensuales México, (1972-1980).
15. Dunne, H. W. and Leman, A. D.: Diseases of Swine. - 4 th. ed. The Iowa State University Press Ames, Iowa, U. S. A. (1975).
16. Endressen, C.: Isolation of Enzymatically Derived -- Fragments of Porcine IgG and Examination of their Reactivity against Staphylococcal Protein A. Acta Path. Microbiol. Scand., Sect. C, -- 87: 177-183 (1979).

17. Engvall, E. and Perlman, P.: Enzyme-Linked-Immuno-sorbent Assay (ELISA). III. Quantitation of Specific Antibodies by Enzyme-Labeled Anti-Immunoglobulin in Antigen-Coated Tubes. *J. Immunol.*, 109: 129-135 (1972).
18. FAO/OMS. Comité de Expertos en Brucelosis. Quinto informe. Serie de Informes Técnicos No.-464, Ginebra, 29 de Junio a 6 de Julio - de 1970. (Publicado en 1972).
19. Feiz, J., Sabbaghian, H. y Miralai, M.: Brucellosis due to Brucella mellitensis in - - Children. *Clinical Pediatrics*, 17: 904, (1979).
20. Glooser, W.J.: Coments on Abattoir-Associated Brucellosis. *J.A.V.M.A.*, 160 (4): 643-644 (1972).
21. Hernández, V.R., Sánchez, S.C., Díaz, G. M. y Muñoz, H.O.: Utilización de la Técnica ensayo - enzimático inmunó-específico (ELISA), para el diagnóstico de Fiebre Tifoidea. -- *Arch. Invest. Med. (Méx.)*, 11:137, (1980).
22. Holgren, J. and Svennerholm, A. M.: Enzyme Linked Immunosorbent Assays for Cholera serology. *Infection and Immunity*, 7: 759-763 (1973).

23. Hurvell, B.: Serological cross-reactions between -
different Brucella species and Yersinia -
enterocolitica.
Acta Vet. Scand., 14: 1-15 (1973).
24. Iturbe, R.R., y Velázquez, E. A.: Evaluación de las
Pruebas de Coombs e Inmunofluorescencia -
Indirecta como métodos de diagnóstico de-
la Brucelosis porcina.
25. Jubb, K. V. F. y Kennedy, P.: Pathology of Domes--
tic Animal. 2nd. ed. Academic Press, Inc.
N. Y. I: 528-532 (1970).
26. Kaltreider, B. H. y Johnson, S. J.: Porcine Immuno--
globulins.
I. Identification of classes and prepara-
tion of specific antisera.
Journal of Immunology, 109 (5): 992-998 -
(1972).
27. Kaltreider, B.H. y Johnson, S.J.: Porcine Immunoglo-
bulins.
II. Antibody Respose of Adult Swine to --
Bovine Gammaglobulin. Journal of Immunol.,
109(5): 999-1002 (1972).
28. Kumar, R. y Rao, C. V.: Porcine Brucellosis in Ta--
mil Nadu.

J. Ind. Vet., 57: 1, (1978).

29. Lamb, L. V., Jones, M. L., Schurig, G. G. y Berman, T. D.:
Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay for Bovine Immunoglobulins Subclass-Specific -- Response to Brucella abortus Lipopolysaccharides.
Infect. and Immun., 26 (1): 240, (1979).
30. Lasta, H. C.: Brucelosis porcina en la República de Argentina Gaceta Vet. B.A. Argentina, 37 (305): 600-607 (1975).
31. Lisle, W. G., Duncan, R., Leland, E. C.: Semen Examination in Dogs with Canine Brucellosis. Am. J. Vet. Res., 40(11): 1589, (1979).
32. Lowry, O. H., Resembrough, N. L., Farr, A. L., -- Randall, R. L.:
Protein measurement with Folin phenol -- reagent.
J. Biol. Chem., 193: 265, (1965).
33. Magee, T. J.: Enzyme-Labelled Immunosorbent Assay -- for Brucella abortus antibodies.
J. Med. Microbiol., 13: 167-172 (1980).

34. Michel, R. S., Liu.: Serologic survey for swine Bru
cellosis in Taiwan, Rep. of China, (1977).
35. Organización Panamericana de la Salud.
Bol. of Sanitaria Panamericana (OMS)
Vol. XIX No. 5: 3-4, (1977).
36. Ruiz, C. M.: Brucelosis un Problema Universal.
2a. Ed., Prensa Médica Mexicana, (1954).
37. Sidney, S.: Estadística no Paramétrica.
4th. ed., Trillas (Méx.), (1978).
38. Thoen, O. S., Pietz, E. D., Armbrust, L. A., y Ha--
rrington, R.:
Enzyme Immunoassay For Detecting Brucella
antibodies in Cow's Milk.
J. of. Clin. Microbiol., 10:2, 222-225 --
(1979).
39. Tizard, I. R.: Inmunología Veterinaria.
1a. ed. esp., Interamericana (Méx.), --
(1979).
40. Tron, F. J., Velázquez, E. A., Olgín, R. F.: La --
Prueba de MIF para el diagnóstico de la --
Brucelosis porcina.
Tesis Prof. F.M.V.Z., U.N.A.M. (1980).

41. Weir, D. M.: Application of Immunological Methods.
Vol. (3), 3rd ed. Blacwell Scietific --
Publications. Austria, (1978).
42. Wood, W. G., Hendricks, J. B. y Goodman, E. D.: -
Brucellosis in Feral Swine.
J. of Wildlife Diseases. 12: 579-582 --
(1976).