

# Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**EMPLEO DE ANTIGENOS SOLUBLES DE Brucella melitensis y Brucella abortus PARA DIFERENCIAR BOVINOS INFECTADOS DE VACUNADOS, UTILIZANDO LA PRUEBA DE INMUNODIFUSION DOBLE**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA  
P R E S E N T A:**

**MA. MERCEDES JUAREZ PEÑA VERA**

**Asesores: MVZ Aurora Velázquez E.  
MVZ Gerardo Elias D.**

**MEXICO, D. F.**

**1982**



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.

CON AGRADECIMIENTO.

A MIS PADRES : ALBERTO Y CARITO

A MI ESPOSO : ALEJANDRO

A TODOS MIS MAESTROS

Y

A MIS AMIGOS

C O N T E N I D O:

	Página
I. RESUMEN	
II. INTRODUCCION .....	1
III. OBJETIVO .....	9
IV. MATERIAL Y METODOS.....	10
V. RESULTADOS.....	13
VI. DISCUSION.....	15
VII. CONCLUSIONES.....	17
VIII. LITERATURA CITADA.....	18

EMPLEO DE ANTIGENOS SOLUBLES DE Brucella melitensis y Brucella abortus PARA DIFERENCIAR BOVINOS INFECTADOS DE VACUNADOS UTILIZANDO LA PRUEBA DE INMUNODIFUSION DOBLE.

Juárez Peña Vera, María Mercedes

Asesores: M. V. Z. Aurora Valázquez E.  
M. V. Z. Gerardo Elias D.

Se estudiaron serológicamente 100 sueros de Bovinos con historia clínica de infección con Brucella sp y de vacunación con B. abortus cepa 19 y se encontró que la prueba de Inmunodifusión doble utilizando el antígeno Poly B es más específica y menos sensible que la prueba de Fijación de Complemento.

En la prueba de Inmunodifusión utilizando antígenos de B. melitensis B115 se encontró que solamente los sueros de ganado infectado reaccionaban con éste antígeno.

Los sueros de ganado vacunado pudieron reaccionar con antígenos elaborados a partir de B. melitensis 16M y B. abortus 19-5

Entonces la prueba de Inmunodifusión doble sirve para diferenciar animales infectados con cepa de campo de los vacunados con B. abortus cepa 19.

Nov/15/82.

## INTRODUCCION.

La Brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa causada por Brucella abortus, B. melitensis, B. suis o B. canis que afecta a bovinos, caprinos, suinos, caninos y a humanos. En el siglo XIX fué descrita como Aborto Contagioso o Aborto Infeccioso. En 1887 Bruce aisló el primer agente del género Brucella a partir de casos de Fiebre de Malta en la isla de éste nombre, más tarde le dio el nombre de Micrococcus melitensis. El agente causal de la Brucelosis Bovina fué descrito hasta 1897 cuando Bang aisló una bacteria Gram negativa, a la cual designó B. abortus (6,21, 34,43).

La Brucelosis plantea un doble problema, el sanitario y el económico;

a) Desde el punto de vista de la Salud Pública se transmite directa o indirectamente del animal al hombre. Como la enfermedad no se transmite normalmente de un ser humano a otro, la profilaxis se reduce a la lucha y eliminación de la infección en los animales afectados (6,18,21,34).

b) Las principales pérdidas económicas por la Brucelosis en los bovinos son por abortos o nacimientos prematuros, infertilidad, disminución en la producción láctea, castigo en el precio de los animales infectados y disminución de las ventas de leche y subproductos lácteos (18,21,34).

La importancia del diagnóstico para la evaluación de la Brucelosis ha recibido particular atención, mejorándose constantemente los métodos utilizados, ya que hay la necesidad de pruebas de diagnóstico altamente sensibles y específicas para poder diferenciar a los animales infectados de los vacunados (5,6,14,15, 16,17,21,40).

El Comité de Expertos en Brucelosis FAO/OMS recomienda;

a) Que la vacunación en los bovinos se realice con B. abortus cepa 19 debido a que se ha comprobado que es estable, teniendo un poder inmunogénico relativamente alto, no se propaga de un animal a otro y es apatógena (6,10).

b) Que se aplique a becerros de 3 a 6 meses de edad con la do-

sis completa ( $50 \times 10^9$  germenos viables), ya que esto elimina los inconvenientes debidos a la persistencia de títulos de anticuerpos residuales de la vacunación cuando se aplica en animales adultos (1,6,18).

En 1977 el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, aprobó el uso de la vacunación con dosis reducida (0.2 ml de la vacuna con cepa 19) en vacas adultas después de 24 meses de la primera vacunación en hatos infectados en los cuales la eliminación de la Brucelosis ha sido inútil por medio del sacrificio de reactores positivos (37,38).

Los hatos lecheros con repetidas inmunizaciones en un periodo corto de tiempo, tienen problemas de diagnóstico.

Un diagnóstico positivo irrefutable de la infección por Brucella es obtenido solamente cuando el microorganismo causal es aislado e identificado. El aislamiento puede efectuarse en el feto a partir del contenido estomacal, bazo, meconio y pulmones. En la vaca adulta, de la leche, de los ganglios linfáticos supramamarios, submaxilares, retrofaringeos e iliacos internos y externos. En el macho es posible el aislamiento a partir de semen (1,6,18,21,43).

No siempre es posible aislar el microorganismo causal en los animales infectados, por eso para el diagnóstico, control y erradicación de la Brucelosis se utilizan pruebas serológicas que son más fáciles de realizar y algunas tienen elevado porcentaje de eficiencia (4,6,8,18,21,43).

Las pruebas de diagnóstico se han clasificado en (6,18),

a) Pruebas de grupo (Anillo en leche).

b) Pruebas individuales (Placa, tarjeta, Lente en tubo, Fijación de Complemento).

c) Pruebas complementarias (Hivanol, Mercaptoetanol, Coombs, - ELISA, Contraelectroforesis, Inmunodifusión).

Ante los métodos tan variados que se utilizan en diferentes países, el Comité de Expertos en Brucelosis FAO/OMS, recomienda que la sensibilidad de las pruebas de aglutinación y los criterios de diagnóstico que se establezcan en cualquier país se expresen siempre en función del Patrón Internacional de suero Anti H. abortus (PI5Ab), que fué establecido en 1968 y contiene 1000 U.I./ml

entendiéndose como una unidad la actividad contenida en 0.9552 mg del PISAb. Este patrón se prepara inyectando una vace con B. abortus cepa 544 biotipo 1. También se recomienda que no se concada - valor diagnóstico a los títulos inferiores a 100 UI/ml para los animales no vacunados o en estado de vacunación desconocido y 200 UI/ml para los animales vacunados. Los animales que tengan de 50 a 100 UI/ml, se someterán a una nueva prueba 60 días después. No obstante, si pertenecen a un hato libre se puede utilizar pruebas complementarias para determinar el estado de infección (1,6,18).

#### Prueba del Anillo en Leche;

Esta prueba es una variante de la prueba de aglutinación y se considera como prueba de grupo. Fue introducida en Alemania por Fleischhauer en 1937, en ésta pueden utilizarse dos tipos de antígenos; uno teñido con hematoxilina denominado antígeno azul y el antígeno rojo teñido con tetrazolio. Salvo en el color, ambos antígenos presentan características similares y ha sido adoptada con ciertas modificaciones por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos y consiste en una suspensión celular de B. abortus cepa 1119-S a una concentración del 4.5%, es una prueba simple, de amplio uso en la localización de hatos infectados, las reacciones falsas positivas ocurren como resultado de infecciones no específicas. Es una prueba fácil de realizar y consiste en tomar 1 ml de leche de 1 a 200 animales; 2 ml de 201 a 500 animales; y 3 ml de 501 a 900 animales, después se le añade una gota de éste antígeno. Por lo que debe ser considerada para la detección de hatos lecheros infectados (1,6,18,20,22,43).

#### Prueba de Aglutinación Rápida en Placa;

Esta prueba fue adaptada por Huddleson en 1932, los métodos y la preparación del antígeno son los recomendados por el Servicio de Investigaciones Agrícolas del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. El antígeno consiste en una suspensión de B. abortus cepa 1119-G al 11% de concentración, teñido con hematoxilina y verde brillante, que si se mezcla una cantidad de 0.03 ml de antígeno con una serie progresivamente decreciente de cantidades de suero, da resultados concordantes con los de la prueba en tubo, -

las diluciones en ambas pruebas son las correspondientes a 25, 50, 100 y 200 UI/ml (1,16,18,21,36).

#### Prueba de Tarjeta:

También es conocida con el nombre del antígeno acidificado, fué descrita por Rose y Roepke en 1957, es una prueba rápida que emplea un antígeno coloreado con Rosa de Bengala y suspendido en una sustancia amortiguadora con un pH de 3.6, la concentración de la B. abortus cepa 1119-5 es del 8%. La prueba es rápida, sensible y específica. Con los bovinos infectados experimentalmente, la reacción es positiva mucho antes que con la prueba de aglutinación en tubo y otras pruebas, esto se debe a que la acidez del antígeno es inactiva a las IgM y solo deja aglutinar a las IgG (1,6,16,18,28,36, 37,38,43).

#### Prueba de Aglutinación en Tubo:

Es satisfactoria y de gran confiabilidad para la detección de infecciones en procesos evolutivos. El antígeno consiste en una suspensión de B. abortus cepa 1119-5 al 0.045% de concentración celular diluido en solución salina fenolada al 0.5%. Puede realizarse utilizando tres procedimientos: a) Dilución decimal, b) Dilución múltiple, c) Método alterno de diluciones múltiples. Respecto a la interpretación de los resultados deben realizarse en función del PISAb. Esta prueba tiene la desventaja de que sustancias aglutinantes no específicas pueden alterar la interpretación (1,16,18,20,21, 29,36,43).

#### Prueba de Fijación de Complemento:

Esta prueba fué descrita por Bordet en 1909, es sensible y específica, la relación entre infección y reacción positiva es estrecha. Los anticuerpos fijadores de complemento en animales infectados han mostrado ser de la clase IgG e IgM. En bovinos la habilidad de la IgG para fijar complemento ha sido atribuida a la subclase IgG<sub>1</sub>. Se ha comprobado que la IgG<sub>2</sub> no fija complemento. Experimentos preliminares indican que la IgM es parcialmente inactivada cuando se calienta a 60 C<sup>o</sup>, bajo esta condición la prueba de

fijación de complemento mide más efectivamente a IgG ( que a IgM - (6,18,21,28,36,37,38,43).

Existen algunas desventajas de la prueba (43):

1.- Está sujeta a reacciones anticomplementarias y reacciones de prozona que pueden ocurrir como resultado de la IgG que bloquea a las IgG.

2.- Se observa variabilidad en resultados dependiendo de las diferencias menores de la técnica, sin embargo los datos comparativos de la evaluación indican que ésta prueba es superior a otras - pruebas serológicas disponibles y como tal, es valiosa en la identificación de animales infectados.

Prueba de Rivanol:

Esta prueba tiene la capacidad de precipitar a la IgM, puede ser utilizada como prueba complementaria para el diagnóstico de la Brucelosis, presenta el inconveniente que tiene baja especificidad en animales recientemente vacunados (6,18,28,29,36,37).

Prueba del 2 Merceptoetanol:

Anderson en 1954 describe la técnica. Se utiliza el merceptoetanol para distinguir los diversos tipos de inmunoglobulinas, tiene la ventaja de reducir el número de animales clasificados erróneamente como positivos cuando se lleven a cabo programas de vacunación permanente. Por ésta prueba se inactiva la IgM, pero también existe el inconveniente que tiene muy baja especificidad en animales recientemente vacunados, sin embargo puede ser considerada como una prueba complementaria útil en el diagnóstico de la Brucelosis (1,6,16,18,22,29).

Prueba de Coombs:

La prueba Antigamma globulina bovina fué descrita por Coombs en 1945, se ha empleado en el diagnóstico de Brucelosis en humanos y en bovinos se considera como una prueba complementaria, pues permite detectar tanto los anticuerpos aglutinantes como los no aglutinantes, la aplicación de esta prueba ha contribuido enormemente al éxito de algunos programas de erradicación (1,6,16,18,36,43).

#### Prueba de Inmunoabsorción Enzimática;

Avrameas y Lriell en 1966 utilizaron el marceaje de anticuerpos y antígenos con enzimas. En 1971, Engvall y Perlmann le designan - el nombre de "Enzyme Linked Immunosorbent Assay" (ELISA). Esta prueba es útil para el diagnóstico de Brucelosis ya que se considera - como una prueba específica y complementaria. Existe el inconveniente de que por su sensibilidad hay problemas en su interpretación. (5,23,32).

#### Prueba de Contraelectroforesis.

Se considera como prueba complementaria en desarrollo, aparentemente requiere pocos reactivos. Se basa en el movimiento de las partículas (Antígeno y Anticuerpo), en un campo eléctrico. Los antígenos que se utilizan deben tener carga negativa. La desventaja que presenta es de requerir material de laboratorio de inversión - inicial elevada (8,16,23).

#### Prueba de inmunodifusión en Ager;

Bruce y Jones en 1958; Díaz y Dorronsoro en 1971 demostraron que el suero de el hombre y animales infectados con Brucella spp tiene precipitinas para diferentes antígenos de Brucella (15).

Esta prueba es útil para detectar anticuerpos específicos - presentes en el ganado vacunado con cepa 19 de B. abortus y también en el suero de ganado infectado naturalmente (4,5,6,14,16,17).

Se ha descrito que el antígeno somático "L" de la Brucella spp en fase lise (5) posee los antígenos A y M. Estos antígenos tienen una molécula inseparable que es el complejo Lipopolisacárido-proteína (LPS). Dependiendo de la especie de Brucella de que se trate uno de ellos es el predominante; tienen antígeno A; B. abortus, - B. suis y B. neotomae. La B. melitensis tiene antígeno M. Las variantes rugosas B. canis y B. canis no poseen los antígenos A y M (6,10,12,13,14,15,16,18).

El Lfb (antígeno "L") es el componente antigénico que juega el papel más importante en las pruebas rutinarias serológicas usadas en el diagnóstico de brucelosis (6,9,13,14,15,16,17,41).

Se han desarrollado varios métodos para la extracción del LPS utilizando ácido tricloroacético, acetona, petróleo-cloroformo-éter y agua fenolada caliente. Con éste último se obtienen una serie de fracciones, entre las cuales está la fracción 3 (F3), aislada de la fase acuosa y la fracción 5 (F5) obtenida de la fase fenólica. Estas dos fracciones tienen actividad endotóxica debido a que contienen el aglutinógeno somático "O" (2,3,5,6,7,13,14,16,17,19,24,30,31,33,35,42).

Readfearn en 1960 al probar la antigenicidad de las fracciones F3 y F5 obtuvo marcadas reacciones entre la F5 y la F3. Esta diferencia biológica es debida a la configuración molecular de la F3 parte lipofóbica y de la parte lipofílica F5, además la F5 contiene una concentración 10 veces mayor de lípidos que la F3 (13).

Jones y col. confirmaron que la mayor actividad endotóxica reside en la fase fenólica (F5) (26).

El LPS obtenido de la F5 también se ha aislado de otras bacterias como Xentohomone campestris, Citobacter freundii, Salmonella minnesote y Yersinia enterocolitica tipo 9 (14,19).

Algunos investigadores han demostrado por diferentes técnicas que el LPS extraído de la fase fenólica es termoestable e insoluble en agua, contiene proteínas, carbohidratos tales como hexosa, ramosa, manosa, galactosa, glucosa, 2 keto-3-deoxioctonato trisacárido (KDO) que es una mezcla de D-L-glicero D-Manoheptosa y también contiene lípidos. Morfológicamente por microfotografías en el microscopio electrónico es imposible diferenciarlo de los LPS enterobacteriales (2,6,13,17,30,31,33,35,39).

Berman y col. utilizan un antígeno soluble de B. abortus (ASDA) el cual es una mezcla de componentes antígenicos que detectan anticuerpos de la misma especificidad como los que se detectan en técnicas de aglutinación y fijación de complemento. Su composición química es de proteínas, hexosa, ácidos grasos, KDO y lípidos, tiene actividad endotóxica, con la ventaja de que es más fácil de preparar (5).

Dentro de los organismos que tienen reacción cruzada con el género Brucella se incluyen a : Pseudomonas aeruginosa, Proteus vulgaris, Lampylobacter comma, Francisella tularensis, Bordetella pertussis y Yersinia enterocolitica tipo 9, en esta última existen deter-

minantes antigénicos comunes situados en el antígeno somático "O" de B. abortus y B. melitensis lo que explica la aglutinación cruzada. Estos determinantes antigénicos comunes están presentes en los lipopolisacáridos de las respectivas bacterias, por lo que - hay la imposibilidad de efectuar un diagnóstico diferencial entre Yersiniosis y Brucelosis en humanos utilizando únicamente la seroaglutinación como prueba diagnóstica (9,12,14,15,18,24,25).

Se ha estudiado la presencia de anticuerpos mediante técnicas de inmunoprecipitación en gel frente al antígeno somático "O" obtenido por la técnica de Westphal (1952) y modificado por Readfearn (1961) utilizando B. melitensis 16 M debido a que tiene la ventaja de difundir mejor en el agar y se ha demostrado que existen dos componentes antigénicos, uno de ellos es el LPS y el otro es el llamado "Segundo Polisacárido" o "Poly B" que es también un antígeno superficial que se obtiene de cultivos en fase lisa (S). Afortunadamente B. melitensis B115 carece del antígeno LPS pero conserva el segundo polisacárido que se encuentra en su citoplasma (4,5,6,10,13,14,15,16,17,41).

Algunas de las propiedades del Poly B son: carece de actividad endotóxica, no está relacionado con aglutininas, difunde rápidamente en el agar y en su composición química demuestra que tiene un alto contenido en carbohidratos (83%), proteínas (5%), no tiene heptosa, KDO, ni lípidos (13,14,17,31).

Se ha demostrado que el Poly B precipita con el suero de ganado infectado pero no con el suero de ganado vacunado con B. abortus cepa 19 (6,17). Por lo tanto se ha pensado en el uso de un antígeno que contenga Poly B pero que carezca de S-LPS para ayudar a la identificación del ganado infectado en poblaciones recientemente vacunadas. Se ha probado que el Poly B crudo con sueros representativos de bovinos da los mismos resultados que con Poly B purificado, así que no hay ventajas en el uso de Poly B purificado para las pruebas de diagnóstico (14,16,17,28).

La reacción que se obtiene utilizando Poly B es más específica en relación con fijación de Complemento, la ventaja de usar este antígeno es que puede diferenciar animales infectados de los vacunados (15,16,17,28).

Debido a la dificultad existente para diferenciar bovinos infectados con cepe de campo de los bovinos vacunados con cepe 19 de B. abortus usando las técnicas convencionales de diagnóstico, el objetivo de éste trabajo fué el de evaluar la utilidad de la Prueba de Inmúnodifusión Doble utilizando antígenos solubles.

## MATERIAL Y METODOS:

Se utilizaron 100 sueros de bovinos procedentes de la Cuenca Lechera de Tizayuca, Hidalgo; se corrió la prueba de Tarjeta y -- Fijación de Complemento para diagnóstico de *Brucella* de acuerdo a la técnica descrita por Alton y col. (1); 50 eran de bovinos -- adultos positivos a las pruebas de Tarjeta y Fijación de complemento con un título de  $\frac{1}{160}$ , de acuerdo al criterio establecido por el Comité de Expertos en Brucelosis FAO/OMS; y 50 sueros eran de becerros vacunados a los 3 meses de edad con dosis completa de la vacuna de *B. abortus* \* y congradas un mes después para su estudio, siendo estos positivos a la prueba de Tarjeta y en la -- prueba de Fijación de Complemento se obtuvieron los siguientes -- resultados: 35 sueros sin título, 7 sueros con un título de  $\frac{1}{10}$ , 8 sueros teniendo un título de  $\frac{1}{20}$ , como se observa en el Cuadro 1.

Los sueros se dividieron en dos grupos para probar el valor diagnóstico de los Antígenos Solubles por la prueba de Inmunodifusión doble;

Grupo I.- 50 sueros de Bovinos adultos infectados.

Grupo II.- 50 sueros de becerros vacunados.

El S-LPS se extrajo a partir de la capa de *B. melitensis* 16M (5), por el método de agua fenolada caliente modificada para -- *Brucella* spp por M. Readfearn y descrita por Baker y Wilson (3).

El Poly B fue extraído a partir de *B. melitensis* D115 (R), por la técnica de Díaz y col (17).

Los antígenos solubles de *B. abortus* cepa 19 (ASBA) y *B. melitensis* E115 (ASEM) fueron extraídos utilizando la técnica de -- Herman y col. (5).

\* Vacuna Anti-*Brucella abortus* (cepa 19) PRECABIVE,  
Productora Nacional de Biológicos Veterinarios.

**CUADRO I****Resultados de las Pruebas Serológicas.**

	No. de sueros procesados	Tarjeta	Fijación de Complemento
Grupo I	50	50/50	50/50 (a)
Grupo II	50	50/50	7/50 (b) 8/50 (c)

Grupo I.- 50 sueros de bovinos adultos

Grupo II.- 50 sueros de becerros vacunados a los 3 meses de edad y sangrados 1 mes después.

a) Con título de 160

b) Con título de 10

c) Con título de 20

Para la Prueba de Inmunodifusión, por la técnica de Luchterlony los geles fueron preparados con agar Noble al 1% en Buffer de Borstos (11) con un pH de 8.3 conteniendo 10% de Cloruro de Sodio (16,17,22).

En cajas de petri de 9.5 cms de diámetro se pusieron 15 ml de agar, después de solidificado se pudo utilizar o se guardó en el refrigerador para posteriormente ser empleadas.

Las cajas de petri con el agar tuvieron un espesor de 0.5 cms, con un molde se hicieron los pozos correspondientes para probar los sueros y antígenos, los pozos tuvieron 0.5 de diámetro, la distancia entre el pozo central y los 6 pozos periféricos fué de 0.2 cms; la distancia entre los pozos periféricos fué de 0.2 cms.

En cada caja de petri cupieron 7 pozos centrales con sus respectivos pozos periféricos.

En cada pozo central se depositó el antígeno correspondiente, en los pozos periféricos se puso 4 sueros problema y 2 sueros control. Los sueros control fueron de un animal infectado y otro de un animal vacunado.

La lectura se hizo a las 24 hrs de incubación a temperatura ambiente. Las lecturas observadas en la prueba de Inmunodifusión se compararon con las obtenidas en Tarjetas y fijación de Complemento.

## RESULTADOS:

En la prueba de Inmunodifusión doble se detectó la presencia de una banda común en todos los Antígenos Solubles, cuando se utilizó un suero de un animal infectado con Brucella sp. Para los -- antígenos S-LPS y ASBA se detectaron dos bandas comunes de precipitación (Figura 1).

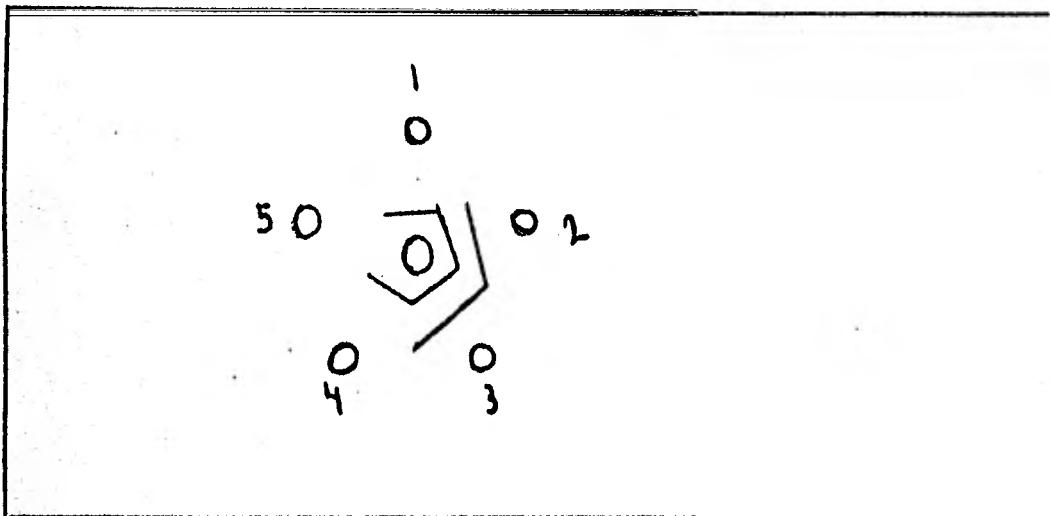


Figura 1.

Representación esquemática de la Inmunodifusión doble.

El pozo central contiene un suero de un animal infectado con Brucella sp.

1) Poly B, 2) S-LPS, 3) ASBA, 4) ASEM, 5) Solución Salina.

Los 50 sueros del grupo I, a las 24 hrs. reaccionaron con el antígeno Poly F y S-LPS, mostrando con éste último dos bandas de precipitación. Con el antígeno soluble de B. melitensis 5 115 - (ASBM) precipitaron 40 sueros con una banda de precipitación y - con el antígeno soluble de B. abortus 19 precipitaron 45 sueros con dos bandas de precipitación.

Los sueros del grupo II, no precipitaron a las 24 horas con los antígenos solubles sino hasta las 48 hrs solamente con los antígenos S-LPS y antígeno soluble de B. abortus 19 (ASEA).

Estos resultados se observan en el Cuadro II.

CUADRO II					
Resultados de las Pruebas de Inmunodifusión.					
Lectura en horas		Poly F (1)	S-LPS (2)	ASEM (3)	ASBA (4)
Grupo I	24 hrs	50/50	50/50	40/50	45/50
		(b)	(a)	(b)	(a)
Grupo II	24 hrs	0/50	0/50	0/50	0/50
	48 hrs	0/50	50/50 (b)	0/50	50/50 (b)

a) Con dos bandas de precipitación.

b) Con una banda de precipitación.

1) Antígeno Poliacárido F

2) Lipopolisacárido

3) Antígeno Soluble de B. melitensis 115

4) Antígeno Soluble de B. abortus 19

## DISCUSION:

La prueba de Inmunodifusión detectó la presencia de 2 bandas de precipitación en el suero de animales infectados naturalmente utilizando el antígeno S-LPS, éstos resultados confirman los hallazgos de Díaz y col (17) que el complejo Lipopolisacárido proteí na libera 2 componentes antigénicos, uno de ellos es el LPS que es el componente de mayor antigenicidad envuelto en las pruebas serológicas rutinarias usadas en el diagnóstico de la Brucelosis y - el otro componente es el Polisacárido B (Poly B).

Se detectó la presencia de una banda de precipitación en el suero de animales infectados naturalmente utilizando el Antígeno Poly B y ninguna banda en el suero de los animales vacunados, - ésto coincide con lo expresado por Jones y col (28) pues encuentran que el Poly B precipita con el suero de animales infectados con Brucella sp, no interviene en las pruebas serológicas rutinarias de diagnóstico, pudiendo así diferenciar a los animales infectados naturalmente de los vacunados.

En los sueros de becerras vacunadas no se detectó banda de precipitación a las 24 horas, sino hasta las 48 hrs utilizando el antígeno S-LPS probablemente debido a la altitud, temperatura del laboratorio y tipo de agar que se utilizó. Por otro lado, éstos resultados confirman los hallazgos de Díaz y col (17,28) que los sueros de el ganado vacunado con B. abortus tiene anticuerpos a éste antígeno lo que presenta un problema en la interpretación diagnóstica.

Utilizando el ASBA se obtuvo reacción de precipitación con 45 sueros (90%) provenientes de animales infectados naturalmente, en los sueros de becerras vacunadas no se detectó banda de precipitación a las 24 horas, sino hasta los 48 hrs, probablemente debido a las condiciones antes mencionadas como la altitud, temperatura del laboratorio y tipo de agar que se utilizó, Sin embargo estos resultados confirman lo expresado por Berman y col (5) que el suero de ganado vacunado puede tener anticuerpos a éste anti-

geno desarrollando una banda de precipitación y el suero de ganado infectado desarrollando dos bandas de precipitación. Por lo que se sugiere que se utilice en el laboratorio con un poco más de purificación ya que es menos específico que los antígenos Poly B y S-LPS.

Por último se estudió la capacidad de reacción de los sueros con el Antígeno Soluble de B. melitensis 115 (ASEM), puesto que este antígeno carece o tiene muy poco S-LPS, pero conserva el Segundo Polisacárido que se encuentra en su citoplasma (28), se encontró que 40 sueros (80%) de bovinos infectados naturalmente desarrollaron una banda de precipitación correspondiente al antígeno Poly B. En el suero de becerros vacunados no se observó ninguna banda de precipitación. Entonces se sugiere también que se utilice en el laboratorio con un poco más de purificación ya que el suero de animales vacunados no precipita con este antígeno.

CONCLUSIONES:

1.- En éste trabajo la Prueba de Inmunodifusión doble utilizando el antígeno Poly B es más específica y menos sensible que la prueba de Fijación de Complemento.

2.- Los sueros de ganado infectado precipitan con los antígenos Poly B, S-LPS, ASBA, ASBM.

3.- Los sueros de ganado vacunado pueden precipitar con los antígenos S-LPS y ASBA.

4.- Los antígenos solubles de E. abortus cepa 19 y E. melitensis 16M son menos específicos que el antígeno Poly B.

LITERATURA CITADA:

1. Alton, G.G., Jones, M.L.: Las técnicas de laboratorio en la Brucelosis. 2da ed. Organización Mundial de la Salud. Geneva. 1975.
2. Baker, P.J., and Wilson, J.B.: Chemical composition and -- biological properties of the endotoxin of Brucella abortus. J. Bacteriol. 90: 895-902, (1965).
3. Baker, P.J., and Wilson, J.B.: Hypoferremia in mice and its application to the bioassay of endotoxin. J. Bacteriol. 90: - 903-910, (1965).
4. Beh, J.K.: Quantitative distribution of Brucella antibody - amongst immunoglobulin classes in vaccinated and infected - cattle. Res. Vet. Sci., 17: 1-4, (1974).
5. Berman, T.D., Wilson, L.B., Moreno, E., Angus, D.N. and -- Jones, M.L.: Characterization of Brucella abortus soluble - antigen employed in immunoassay. J. Clin. Microbiol., 11: - 355-362, (1980).
6. Berman, T.D.: Brucellosis. An. Sci., 6: 271-286, (1981).
7. Bhongbhibhat, N., Elberg, S.: Characterization of Brucella skin-test antigens. J. Infect. Dis., 122: 70-82, (1970).
8. Carroll, A.J., Gaydos, M., and Chen, P.H.: Counterimmuno- electrophoresis: A method for the determination of bacterial polysaccharide antigens. Lab. Med., 11: 511-514, (1967).
9. Corbel, J.M., and Phillip, H.I.J.: The relationship of Brucella abortus agglutinogenic antigens to the receptor sites for fibrin clots. Res. Vet. Sci., 18: 91-97, (1977).

10. Costerton, W.J., Ingram, M.J., and Cheng, K.H.: Structure and Function of the cell envelope of Gram negative bacteria. Bacteriol. Rev., 38: 87-110, (1974).
11. Chase, M.W.: Methods in immunology and immunochemistry. Academic Press Inc. New York Vol. 2: 390-396, 1968
12. Díaz, R., Jones, M.L., and Wilson, J.B.: Antigenic relationship of Brucella ovis and Brucella melitensis. J. Bacteriol., 93: 1262-1268, (1967).
13. Díaz, R., Jones, M.L., Leong, D., and Wilson, J.B.: Surface antigens of smooth Brucellae. J. Bacteriol., 96: 893-901, - (1968).
14. Díaz, R., e Dorransoro, I.: Contribución al diagnóstico serológico de Brucelosis y Yersiniosis I. Utilidad de la reacción de precipitación en gel. Rev. Cli. Esp., 121: 367-372, (1971).
15. Díaz, 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).
16. Díaz, R., Marvi - Poma, E., and Rivero, A.: Comparison of - counter-immunoelectrophoresis with other serological tests in the diagnosis of human brucellosis. Bull. World Health Organ., 53: 417-424, (1976).
17. Díaz, R., Gerates, 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).
18. FAO/WHO. Fifth report of the joint FAO/WHO expert committee - on Brucellosis, WHO technical Report Series no. 464. World - Health Organization, Geneva.

19. Galanos, C., Lüderitz, O. and Westphal O.; A new method for the extraction of R Lipopolysaccharides. Eu. J. Biochem., 9: 245-249, (1969).
20. Gray, W.D., and Martin, S.W.; An evaluation of screening programs for the detection of Brucellosis in dairy herds. Can. J. - Comp. Med., 44: 52-60, (1980).
21. Hagan, Bruner, D.W., Gillespie, J.H.; Enfermedades Infecciosas de los animales domésticos. La Prese Médica Mexicana 3 ed. México, 1970.
22. Herbert, W.J.; Inmunología Veterinaria. Ed. Acribia, Zaragoza, España, 1972.
23. Hernández, V.R., Muñoz, O., Rodríguez, G.G., Arroyo, S.G., y Gutiérrez, G.; Contraelectroforesis para la identificación de anticuerpos contra antígenos "O" de Salmonella thiphí I. Archiv. Invest. Med., 10 23-31, (1979).
24. Hurvell, B.; Serological cross-reactions between diferent - Brucella species and Yersinia enterocolitica. Acta. Path. Microbiol. Scand. , 81: 105,112,(1973).
25. Hurvell, B.; Serological cross-reactions between diferent Bru-cella species and Yersinia enterocolitica. Acta. Path. Microbiol. Scand., 81: 113-119, (1973).
26. Jones, M.L., and Berman, D.T.; Studies of Brucella lipopolysaccharide. International Symposium on Brucellosis (II), Rabat -- 1975. Develop. Biol. Standard., Vol 31: 62-67, 1976.
27. Jones, M.L., Díaz, R., and Berman, D.T.; Endotoxic activity -- of rough organisms of Brucella species. Infect. Immun., 13: 1638-1641, (1976).

28. Jones, M.L., Berman, D.T., Moreno, E., Dayoe, R.L., Gilsdorf, J.M., Huber, D.J., and Nicoletti, P.: Evaluation of a radial immunodiffusion test with polysaccharide B antigen for diagnosis of bovine Brucellosis. J.Clin. Microbiol., 12: 753-760, (1980).
29. Kaneene, J.M.B., Anderson, K.R., Muscolat, C.H.C., Johnson, D.W.: Cell-mediated immune responses in cattle vaccinated with Brucella abortus strain 19 vaccine and nonexposed control animals of the same age. Am. J. Vet. Res., 40: 999-1004, (1979).
30. Kellerman, D.G., Foster, J.W., and Badakhsh, F.F.: Comparison of chemical components of cell walls of Brucella abortus strains of low and high virulence. Infect. Immun., 2: 237-243, (1970).
31. Laveve, C., et Kasselneau, J.: Comparaison de la composition chimique d'une fraction lipopolysaccharidique et d'une fraction polysaccharide isolées de Brucella melitensis. Eu. J. Biochem., 2: 189-198, (1969).
32. Lamb, L.V., Jones, M.L., Schuring, G.G., and Berman, T.D.: - Enzyme linked immunosorbent assay for bovine immunoglobulin subclass specific response to lipopolysaccharides of Brucella abortus. Dates no published. Department of Veterinary Science, Virginia Polytechnic Institute and State University.
33. Leong, D., Diaz, R., Milner, K., Rudbach, J., and Wilson, J.B.: Some structural and biological properties of Brucella endotoxin. Infect. Immun., 1: 174-182, (1970).
34. Merchant, A.I., Packer, R.A.: bacteriología y Virología Veterinaria. la reimpresión ed. Acribia, Zaragoza, España.
35. Moreno, E., Pitt, P.W., Jones, M.L., Scuring, G.G., and Berman, T.D.: Purification and characterization of smooth and rough lipopolysaccharides from Brucella abortus. J. Bacteriol., 138: 361-369, (1972).

36. Nicoletti, P.: Problems in the diagnosis of bovine Brucellosis. Int. Symp. Brucell. hepat 1975 - Dev. Biol. Stand., 31: 131-135, 1976.
37. Nicoletti, P., Jones, M.L., Berman, T.D.: Adult vaccination - with standard and reduced doses of Brucella abortus strain 19 vaccine in a dairy herd infected with Brucellosis. JAVMA., 173: 1450-1456, (1978).
38. Nicoletti, P., Jones, M.L., Berman, T.D.: Comparison of the - subcutaneous and conjunctival route of vaccination with Brucella abortus strain 19 vaccine in adult cattle. JAVMA., 173: - 1450-1456, (1978).
39. Osborn.: Structure of lipopolysaccharide. Ann. Rev. Biochem., 38: 511-513, (1969).
40. Raybould, G.J.T., and Chantler, S.: Serological differentiation between infected and vaccinated cattle by using purified soluble antigens from brucella abortus in hemagglutination -- system. Infect. Immun., 29: 435-441, (1980).
41. Schuring, G.G., Jones, M.L., Speth, L.S., and Berman, T.D.: Antibody response to antigens distinct from smooth lipopolysaccharide complex in Brucella infection. Infect. Immun., 21: 994-1002, (1978).
42. Stemshorn, B. and Nielsen, K.: The bovine immune response to Brucella abortus I. A water soluble antigen precipitated by sera of some naturally infected cattle. Can. J. Comp. Med., - 41: 152-159, (1977).
43. Sutherland, S.S.: Immunology of bovine Brucellosis. Commonwealth Bureau of Animal Health. The Veterinary Bulletin., 10: 359- 368, (1968).