



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"CUAUTITLAN"

COMPARACION DE LOS POLISACARIDOS - B DE  
TRES CEPAS DIFERENTES DE Brucella melitensis,  
UTILIZADOS EN EL DIAGNOSTICO DE  
BRUCELOSIS BOVINA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

LUZ MINERVA CORTES MEDINA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1987.



## **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 está 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 :

RESUMEN .....	1
ABREVIATURAS .....	3
INTRODUCCION .....	4
OBJETIVOS .....	25
MATERIAL Y METODOS .....	26
RESULTADOS .....	35
DISCUSION .....	50
CONCLUSIONES .....	55
APENDICE :	
SOLUCIONES Y REACTIVOS .....	56
BIBLIOGRAFIA .....	58

## RESUMEN

El objetivo principal de este trabajo fué el determinar cuál de tres diferentes cepas de Brucella melitensis, dos lisas: 16-M y Rev-1, y una rugosa: B-115, producía una mayor cantidad de antígeno polisacárido-B. Este fué extraído con ácido tricloroacético 0.5M y precipitado con etanol frío al 95%. La cuantificación de cada antígeno se realizó siguiendo la técnica descrita por Dubois. Se realizaron tres repeticiones para la extracción del polisacárido-B a partir de cada cepa, y el análisis estadístico utilizado para la comparación de los rendimientos obtenidos de las tres cepas fué: Análisis de varianza y Prueba de significancia de Tukey.

La efectividad de los tres polisacáridos-B fué evaluada utilizándolos en la Prueba de Inmunodifusión Radial (IDR), probando sueros de bovinos sospechosos de una infección por Brucella, bovinos vacunados tanto con dosis reducida, como con dosis normal de la cepa 19 de Brucella abortus y sueros de animales control.

Las cantidades promedio de polisacárido-B obtenidas a partir de 1 gramo de peso húmedo de bacterias fueron las siguientes: 16-M: 236.6mcg ; Rev-1: 202.3mcg y B-115: 74.7mcg. El análisis estadístico no mostró diferencia significativa entre las cepas lisas, pero si la hubo al comparar éstas dos con la cepa rugosa. La efectividad de los polisacáridos-B en la prueba de IDR resultó

satisfactoria para el diagnóstico de brucelosis bovina.

Las cepas lisas de Brucella melitensis (16-M y Rev-1) fueron las más adecuadas para la extracción de polisacárido-B, ya que el rendimiento obtenido a partir de estas fué mucho mayor que el obtenido de la cepa rugosa (B-115) .

ABREVIATURAS

ATA	Acido Tricloroacético
Ac	Anticuerpo
Br	Brucella
cm	Centimetro
S-LPS	Complejo LPS-proteina
FC	Fijación de Complemento
°C	Grado centígrado
g	Gravedades
gr	Gramo
HI	Hemólisis Indirecta
hrs	Horas
IDR	Inmunodifusión Radial
KDO	2-keto-3-deoxioctonato
LPS	Lipopolisacárido
lt	Litro
2-ME	2-Mercaptoetanol
m.o.	Microorganismo
mcg	Microgramo
mcl	Microlitro
ml	Mililitro
mm	Milímetro
min	Minuto
M	Molar
nm	Nanómetro
Poli-B	Polisacárido-B
SSF	Solución Salina Fisiológica

## INTRODUCCION

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa causada por bacterias del género *Brucella*, que afecta a un gran número de especies animales, incluyendo al hombre, por lo que representa un serio problema de salud pública (1, 3, 7, 30, 39) .

Esta enfermedad es una zoonosis de importancia mundial para la salud pública y la economía. Aunque la brucelosis bovina se ha logrado erradicar en algunos países, mediante campañas basadas en el sacrificio de reses infectadas, en otros, continúan tenazmente los programas de erradicación. La brucelosis caprina es la causa más común de infección en el hombre y sigue teniendo muy amplia difusión, particularmente en los países en vías de desarrollo, ya que pocas campañas para combatirla han tenido buen éxito. Y, si bien la vacunación del ganado vacuno, ovino y caprino tiene cierta utilidad como medida de control el objetivo más deseable, la erradicación, depende de la localización y sacrificio de los animales infectados. En cualquier caso, toda esperanza de éxito tiene que fundarse en técnicas de laboratorio sólidamente establecidas que tengan la capacidad de eliminar resultados falsos positivos y detectar, oportunamente, animales infectados (1,39).

### ANTECEDENTES

En 1887, Bruce ( 9 ) , estudiando la enfermedad humana conocida como fiebre de malta, mediterránea u ondulante, descubrió en

el bazo de los sujetos muertos un microorganismo (m.o.) al que llamó Micrococcus melitensis . En 1897, Bang ( 9 ), aisló al m.o. responsable del aborto contagioso en el ganado y lo llamó Bacillus abortus . Estas dos enfermedades se estudiaron independientemente durante mucho tiempo y no fué, sino hasta el trabajo de Evans ( 9 ) , en 1918, cuando se estableció una relación entre ambas (8, 16, 27, 30) Estas dos enfermedades, una primariamente en cabras y en forma secundaria en el hombre, y la otra propia del ganado, se consideran actualmente íntimamente relacionadas. En 1914, Traum ( 9 ), aisló una bacteria de fetos expulsados prematuramente por las marranas y se sabe ahora que está muy relacionada con el bacilo de Bang y el de la fiebre ondulante. Tratándose de tres especies diferentes, estos gérmenes recibieron el nombre genérico de Brucella y se conocen como: Brucella melitensis (Br. melitensis), Brucella abortus (Br. abortus) y Brucella suis (Br. suis) La infección producida por las bacterias de este género es conocida como "Brucelosis" (9, 17, 27).

#### PATOGENIA

En el hombre la brucelosis es causada por las siguientes especies de Brucella: Br. melitensis, Br. abortus, Br. suis, Br. canis ; la proporción de cada una se desconoce en México, pero el consenso es que las infecciones más severas son las causadas por Br. melitensis. Investigaciones epidemiológicas sugieren que del 50 al 80% de los humanos son susceptibles a la infección por Br. melitensis (11, 59)



Esta enfermedad propia de los animales se transmite al hombre por ingestión, contacto, inhalación e inoculación accidental, siendo más frecuente entre médicos veterinarios, personal de mataderos y de laboratorio. En los bovinos, la fuente principal de infección son los fetos abortados, envolturas fetales y descargas vaginales, aunque el m.o. también es eliminado a través de la leche, heces y orina (3, 15, 30, 34, 44, 53, 56) .

Desde el punto de vista de la salud pública debe considerarse a esta infección no sólo como causa de enfermedad, sino también como factor nocivo para la producción de alimentos. Por otro lado, causa grandes pérdidas a la industria pecuaria por concepto de abortos y otros problemas reproductivos, reemplazo, disminución láctea llegando, inclusive hasta la muerte de terneros de calidad e interrupción de líneas genéticas (3, 13, 15, 55) .

En el ganado bovino la infección natural casi siempre es debida a Br. abortus, aunque también puede serlo por Br. melitensis y Br. suis . Esta enfermedad está caracterizada por abortos en las vacas con madurez sexual y por lo tanto, se considera como una importante pérdida económica para la industria ganadera en todo el mundo. El m.o. también infecta los órganos reproductores masculinos y se ha encontrado relacionado al higroma de la rodilla de los bovinos (8, 10, 27) . Las principales puertas de entrada para el m.o. son: la mucosa bucal de terneras que beben leche infectada; la nasofaringe y conjuntiva de los bovinos expuestos al m.o. y ocasionalmente, el aparato genital de vacas

y toros. Después de penetrar al huésped, Br. abortus se establece en ganglios linfáticos regionales y posterior a ésto, se generaliza en los tejidos del huésped. Continúa proliferando en el tejido linforreticular produciendo una infección generalizada que no se restringe a la ubre, útero y ganglios asociados, aunque estos órganos contienen gran cantidad de bacterias y por ello son sitios primarios para el aislamiento bacteriano (3, 17, 27) .

#### INCIDENCIA Y PREVALENCIA

En México, la brucelosis del ganado bovino se encuentra ampliamente distribuida, siendo las zonas de mayor incidencia el Sureste, el Centro y las zonas costeras, disminuyendo considerablemente en la parte Norte del país, debido principalmente a las condiciones de explotación, que en su mayoría son de tipo extensivo. Existe una incidencia muy alta de brucelosis en las cuencas lecheras del país, indistintamente de su localización geográfica, debido a las condiciones de manejo, que en gran parte son de tipo intensivo y están sujetas a alta productividad, lo que hace al ganado más susceptible para contraer esta enfermedad ( 54 ) .

La Dirección General de Sanidad Animal (DGSA) notificó los datos presentados en la Tabla No. 1 sobre prevalencia de brucelosis bovina y animales vacunados en la República Mexicana.

#### CARACTERÍSTICAS DEL MICROORGANISMO

Los miembros del género *Brucella* son pequeños cocobacilos

TABLA No. 1.

PREVALENCIA DE BRUCELOSIS BOVINA Y ANIMALES VACUNADOS EN LA REPUBLICA MEXICANA

BOVINOS PRODUCTORES DE LECHE.			
AÑO	Total de Animales Muestreados.	% de Positivos del total de animales	Animales Vacunados
1981	77,165	4.42	50,186
1982	89,160	10.96	106,213
1983	70,014	5.46	92,512
1984	60,355	6.26	38,145

BOVINOS PRODUCTORES DE CARNE.			
AÑO	Total de animales Muestreados	% de Positivos del total de animales.	Animales Vacunados.
1981	53,974	6.17	22,232
1982	49,237	5.57	53,550
1983	86,023	5.13	32,143
1984	48,045	6.29	18,948

DGSA, 1985. Fuente : Dirección de Estadística :Publicaciones Mensuales. D.G.S.A. -S.A.R.H.

gramnegativos y aerobios, inmóviles, no esporulados y con relativa inactividad metabólica. Estos m.o. son parásitos obligados de los animales y del hombre, siendo característica su localización intracelular (10, 17, 25, 30) .

Se considera que el género *Brucella* consta de seis especies: *Br. melitensis*, *Br. abortus*, *Br. suis*, *Br. neotomae*, *Br. ovis* y *Br. canis* . En general las cuatro primeras especies antes mencionadas adoptan la forma lisa, mientras que *Br. ovis* y *Br. canis* se han observado sólo en forma rugosa (1, 17, 25) .

Por lo que respecta a los medios de cultivo en el laboratorio su crecimiento es lento, especialmente al iniciarse el cultivo, por lo que las colonias no son visibles sino hasta después de 48 horas (hrs) o más, incubadas a 37°C. Los m.o. suelen presentarse aislados o en pares, y forman pequeñas cadenas en los cultivos (9, 25, 30, 40) . Estos organismos se desarrollan en aerobiosis, aunque los cultivos primarios de *Br. abortus* y *Br. ovis* crecen particularmente pobres y requieren una atmósfera que contenga de 5 a 10% de CO<sub>2</sub> , mientras que las especies restantes crecen bajo condiciones atmosféricas normales (1, 40) .

Algunas cepas de *Brucella*, sobre todo en el primer cultivo sólo se desarrollan en presencia de suero y para su aislamiento se recomiendan como medios de cultivo básicos (no selectivos): el agar dextrosa con suero, agar triptosa con suero, agar tripti-casa-soya (TSA), agar *Brucella*, agar albimi y agar papa (1,10,40).

En general, las brucelas aisladas a partir de tejidos son

del tipo liso ( S ) . Las colonias lisas típicas son pequeñas, redondeadas, convexas y traslúcidas. El género *Brucella* se disocia con bastante facilidad dando lugar a la forma rugosa. La transformación S----> R (de cepa lisa a rugosa) se acompaña, además de aparición de colonias rugosas, de disminución de la virulencia y cambios de especificidad inmunológica (9, 25) .

Las pruebas empleadas para separar los biotipos del género *Brucella* requieren de investigación del metabolismo oxidativo, de la prueba de sensibilidad al bacteriófago Tbilis y de pruebas serológicas empleando sueros monoespecíficos (41, 42, 51)

#### Características antigénicas en general

El análisis inmunoelectroforético de extractos de células de *Brucella* ha mostrado una gran variedad de componentes antigénicos solubles, algunos de los cuales son netamente antígenos de superficie (9, 26, 28)

Las diferentes especies del género *Brucella* no pueden diferenciarse por reacciones de aglutinación, pero pueden distinguirse por adsorción de aglutininas. Fueron Wilson y Miles ( 60 ) quienes demostraron la presencia de dos antígenos primordiales en la superficie de las brucelas lisas, identificándolos como A y M. Estos son lipopolisacáridos (LPS) asociados con cantidades variables de polipéptidos, que poseen características endotóxicas similares a las endotoxinas de las enterobacterias ( 43 )

Los antígenos A y M se encuentran en diferente proporción en las tres especies principales del género *Brucella*: *Br. melitensis*

Br. abortus y Br. suis Además se ha demostrado la presencia de un antígeno-L superficial, similar al antígeno Vi de Salmonella. El antígeno A o abortus es el principal determinante de superficie tanto en Br. abortus, como en Br. suis, y es un determinante secundario en Br. melitensis, siendo la proporción de antígeno A : M en Br. abortus de 20:1, mientras que en Br. melitensis de 1:20 (9) .

La pared celular de las bacterias del género Brucella contiene tres polímeros que yacen exteriores a la envoltura del péptidoglucano: lipoproteína, membrana celular y LPS (Fig. 1 y Fig. 2) .

El LPS consiste en un complejo lípido, denominado lípido-A al cual se le fija un polisacárido constituido por un centro y una serie terminal de unidades repetidoras. El lípido-A consiste en una cadena de unidades de glucosaminodisacárido, conectadas mediante puentes de pirofosfato, a los cuales se le han fijado numerosos ácidos grasos de cadena larga, el ácido  $\beta$ -hidroximíristico (un ácido graso con catorce átomos de carbono) está siempre presente, y es exclusivo para este lípido (9, 17, 30) .

El LPS está fijado a la membrana exterior mediante enlaces hidrofobos ; es sintetizado sobre la membrana interna y es transportado a su posición exterior final. Su función es desconocida. Aunque los mutantes que carecen de varias partes del polisacárido crecen normalmente en cultivo, los mutantes a los que les falta el lípido-A nunca han sido observados, por tanto, se postula un papel esencial para el lípido-A (17, 30) .

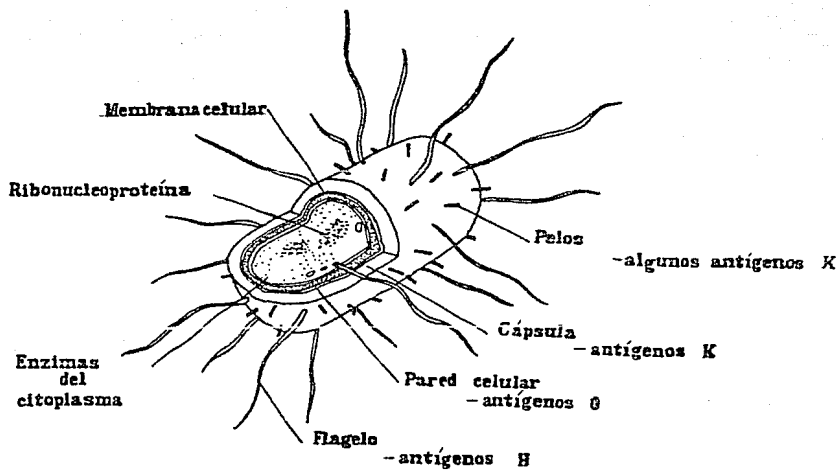


Fig. 1. Estructura de una bacteria y localización de sus principales antígenos.

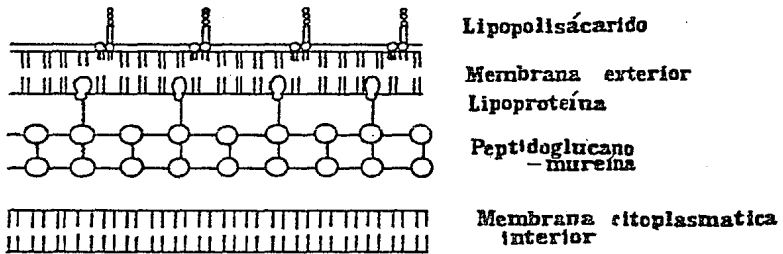


Fig. 2. Modelo de cubierta de célula bacteriana gramnegativa.



Los estudios iniciales sobre la relación antigénica entre especies rugosas y lisas de *Brucella* señalan que las cepas rugosas no poseen la endotoxina de tipo LPS, asociada con la actividad aglutinógena de las colonias lisas (18, 19) .

#### Características Del Antígeno Polisacárido-B

Díaz et al., en 1968 ( 19 ), demostraron por inmunolectroforesis que extractos obtenidos de cepas lisas de Br. abortus y Br. melitensis, con ácido tricloroacético (ATA), éter-agua y fenol-agua, contienen dos componentes de movilidad catódica. Uno de ellos ha sido identificado como un complejo LPS-proteína (S-LPS), con actividad endotóxica y especificidad para aglutinógenos de superficie de cepas lisas de *Brucella*. El otro componente se distingue por su facilidad para difundir en las pruebas de inmunolectroforesis e inmunodifusión, carece de actividad endotóxica, posee gran cantidad de carbohidratos y ha sido llamado "componente-1", "segundo polisacárido" o polisacárido-B (poli-B) (4, 6, 21, 22, 23, 31) . Este componente aparentemente no juega un papel importante en las pruebas de aglutinación, ya que los anticuerpos (Ac) dirigidos contra este polisacárido, presentes en sueros de animales infectados, pueden ser removidos por adsorción con el antígeno, sin que se vean afectados los títulos de aglutininas en el suero (19, 21) .

El antígeno polisacárido-B se encuentra presente en la superficie celular de cepas lisas de *Brucella*, pero únicamente ha podido ser obtenido a partir de la fracción soluble del citoplasma

de cepas rugosas de Br. melitensis, específicamente de la cepa B-115, según las investigaciones realizadas por Díaz et al en 1979 ( 22 ) , con experimentos de adsorción de cepas de Brucella spp (rugosas y lisas) y extractos sonicados de las mismas. Dichos resultados fueron confirmados por Moreno et al ( 45 ), cuando fueron extraídas fracciones solubles del citoplasma y de la rembrana celular con ATA y el poli-B pudo ser detectado únicamente en la fracción citoplasmática de la cepa rugosa B-115 de Br. melitensis ( 6 ) . Además, debido a que las fracciones solubles del citoplasma quizá incluyan productos liberados después de la ruptura de la célula es probable que el poli-B sea un componente del espacio periplásmico ( 6, 72).

En general, las diferentes investigaciones que han analizado químicamente al poli-B revelan que está constituido por : 83% de carbohidratos, 5% de ácidos nucleicos y 5% de proteínas : sin embargo, no contiene lípidos, 2-keto-3-deoxioctonato (KDO), ni heptosas, como previamente había sido determinado ( 6, 12) .

Las investigaciones químicas realizadas por Lacave et al ( 35 ), muestran los resultados de un importante estudio comparativo entre las fracciones S-LPS y polisacárido de Br. melitensis y demuestran que la principal diferencia entre ambas fracciones es la presencia de pequeñas cantidades de Lipido-A (1%) en el LPS. El comportamiento de fracciones LPS y polisacárido sobre columnas de DEAE-celulosa es muy similar, y las pequeñas ----

diferencias observadas pueden ser explicadas por cambios debidos a la solubilidad del lípido-A presente en el LPS .

#### RESPUESTA INMUNE

La inmunidad contra Brucella spp en los animales domésticos tiene algunas características que la diferencian de la respuesta contra infecciones bacterianas.

El organismo tiene en realidad tres sistemas de defensa, que actúan de manera coordinada para combatir una infección. Dichos sistemas son :

- a) Sistemas inespecificos
- b) Inmunidad humoral
- c) Inmunidad celular

#### Sistemas inespecificos

Agrupados bajo el rubro de resistencia, los sistemas inespecificos comprenden una verdadera batería de barreras anatómo-fisiológicas, bioquímicas y celulares, que comparten el hecho de ser inespecificas y no inducidas, esto es, estos sistemas son independientes de la existencia de un contacto previo con el antígeno.

La barrera inespecifica más importante es la fagocitosis. La fagocitosis no inmune es mediada fundamentalmente por los polimorfonucleares, y en especial, los neutrófilos. Los mononucleares (macrófagos y monocitos) también participan, pero en menor grado. La capacidad de fagocitar, sobre todo en la sangre

donde el fenómeno es libre, es decir, la bacteria está suspendida en un fluido, depende mucho de las características fisicoquímicas externas de la partícula que se va a fagocitar. En el caso de la mayoría de las brucelas, la presencia externa de una cápsula previene la fagocitosis al generar una unidad ionizada e hidrofílica, a la cual el fagocito no puede acercarse con facilidad. Sin embargo, incluso con la cápsula presente, sí se lleva a cabo una fagocitosis considerable, sobre todo por los polimorfonucleares ( 58 ) .

#### Inmunidad humoral

Las brucelas estimulan una poderosa reacción humoral, que se demuestra por los elevados títulos de Ac que se producen. Estos Ac son de la clase IgG e IgM en infecciones naturales, pero sólo IgM en vacunaciones con la cepa 19 de Br. abortus - ( 47 ) . Las razones de esto no son bien conocidas. Aparentemente después de la vacunación aparecen títulos tanto de IgG, como de IgM. Sin embargo, los de IgG son de bajo nivel y desaparecen con rapidez, contrario a lo que sucede normalmente, donde es la IgM la que desaparece. Además, esto sucede en animales adultos, pues las becerras no puberes desarrollan títulos que en ambas inmunoglobulinas son transitorios y desaparecen (47, 58) .

Independientemente de lo ocurrido con las inmunoglobulinas en los animales inmunizados con la cepa 19, hay que tener presente que la vacunación genera linfocitos B y T de memoria, los que

en un segundo contacto con la brucela desarrollan, en un lapso de tres a cinco días, una respuesta secundaria. Este hecho representa una gran ventaja con respecto a los animales no vacunados (55, 58) . Aún así el efecto de los Ac es poco claro y aparentemente no juegan un papel relevante en la inmunidad o en la recuperación de animales infectados ( 47 ) .

Una de las actividades de los Ac que sí debe ayudar es la capacidad de adherirse a macrófagos una vez que han sido activados por la unión con el antígeno (opsonización) (47, 56, 58).

### Inmunidad celular

La habilidad que tienen las brucelas de penetrar a las células, especialmente los polimorfonucleares, las protege tanto de las sustancias bioquímicas inespecíficas, como de los Ac. En casos como este el organismo reacciona desarrollando una defensa a base de inmunidad celular. Dicha defensa está centrada en la actividad de los linfocitos T y los macrófagos.

Los linfocitos T, al contacto con el antígeno (en respuesta secundaria), se dividen formando por lo menos cinco diferentes tipos celulares: las células T represoras, T-ayudantes, T-de memoria, T-secretoras (linfoblastos) y las células T-citotóxicas. De estas, las que tienen una acción directa son las T-citotóxicas, que en conjunción con un tipo especial de linfocito denominado "K" llevan a cabo la destrucción de las células "blanco", esto es, la célula que está infectada con la brucela. Es importante

señalar que en el caso del linfocito " K " existe una colaboración estrecha entre los Ac y este tipo de células. La célula blanco modificada por la infección bacteriana estimula la formación de Ac contra su superficie ; posteriormente el linfocito "K" establecerá contacto con ella a través del fragmento Fc del Ac específico ( 39 ). La brucela liberada puede ser atacada por Ac y quizá destruida por el complemento . La destrucción final de la brucela es aparentemente llevada a cabo sólo por los macrófagos, en especial (o exclusivamente) por macrófagos activados, en los que se ha observado un aumento en el contenido de enzimas hidrolíticas (39).

Sin embargo, estudios recientes acerca de la activación de macrófagos en brucelosis experimental han estado encaminados a examinar los mecanismos (in vivo) que pueden limitar la respuesta inmune, y de esta manera provocar una infección de tipo crónico con el parásito intracelular facultativo ( 57 ) . Al respecto, Iturbe y Goodsaid, en 1985 ( 29 ) utilizaron el marcaje de macrófagos con naranja de acridina para seguir la cinética de presentación de fusiones fagosoma-lisosoma, a través de la infección con Br. abortus y concluyen que la bacteria logra escapar del fagosoma en base al éxito de infecciones logradas con esta cepa .

Parece ser que la respuesta inmune humoral a infecciones causadas por parásitos intracelulares facultativos, como lo es Br. abortus, ofrece pocas ventajas para el hospedero y un camino más efectivo para la eliminación de esta bacteria lo constituye la inmunidad celular .

## DIAGNOSTICO Y PREVENCIÓN

El diagnóstico de la brucelosis se realiza por dos métodos: el bacteriológico y el serológico ; el primero es determinante ya que se realiza mediante el aislamiento e identificación del germen. El segundo es presuntivo y se lleva a cabo por medio de la identificación de Ac específicos en suero ( 38 ) . La importancia del diagnóstico para la evaluación de brucelosis ha recibido particular atención mejorando constantemente los métodos utilizados, ya que existe la necesidad de contar con pruebas de diagnóstico altamente sensibles y específicas para poder diferenciar animales infectados, de los vacunados con la cepa 19 de Br. abortus . ( 32 ) .

Un diagnóstico positivo irrefutable de una infección por Brucella es obtenido únicamente cuando el m.o. causal es aislado e identificado . En el animal adulto el aislamiento puede hacerse a partir de bazo, leche y ganglios linfáticos supramamarios, submaxilares, retrofaríngeos, iliacos, etc. En el macho, además, puede hacerse el aislamiento a partir de testículo, epidídimo, semen, etc. En el feto el germen puede ser aislado a partir de bazo, contenido estomacal, pulmones, etc. (27, 31) .

No siempre es posible aislar al m.o. causal en los animales infectados. Debido a esto, para el diagnóstico, control y erradicación de la brucelosis se utilizan pruebas serológicas que son fáciles de realizar y confiables, aunque presentan ciertas limitaciones como la dificultad de detectar la enfermedad durante

el período de incubación (infecciones recientes) ; en estados crónicos de la enfermedad los títulos de A<sub>c</sub> son frecuentemente irregulares, ya que caen a niveles bajos y fluctúan durante períodos indefinidos (33, 47) . Particularmente en esta enfermedad se presenta la dificultad de distinguir A<sub>c</sub> producidos por infección natural, de aquellos producidos por reciente vacunación con la cepa 19 de Br. abortus. Las técnicas frecuentemente utilizadas en el diagnóstico serológico de brucelosis incluyen: prueba de tarjeta, prueba de aglutinación rápida en placa, prueba de aglutinación lenta en tubo, prueba de aglutinación en tubo con 2-Mercaptoetanol (2-ME) y prueba de fijación de complemento (FC). Existen técnicas de reciente desarrollo, entre las que tenemos: prueba de Inmunodifusión Radial (IDR) utilizando antígeno polisacárido-B y prueba de hemólisis indirecta (HI) (1, 47) .

#### Prueba de Tarjeta

Se le conoce también con el nombre de antígeno acidificado. Es una prueba rápida, sensible y específica. Con sueros de bovinos infectados experimentalmente la reacción es positiva mucho antes que la prueba de aglutinación en tubo y otras pruebas ; esto se debe a que la acidéz del antígeno inactiva a las IgM y sólo deja aglutinar a las IgG. Es una prueba de tipo cualitativo (2, 16, 38, 47, 48) .



#### Prueba de aglutinación rápida en placa

Se conoce también como reacción de Huddleson. Es una prueba de seroaglutinación rápida y sencilla, que se utiliza como prueba preliminar para conocer la prevalencia de la enfermedad. Es poco influida por fenómenos de prozona y hemólisis de los sueros. Es menos sensible que la prueba de tubo y con tendencia a presentar aglutinaciones inespecíficas (1, 47) .

#### Prueba de aglutinación lenta en tubo

Es también una prueba de seroaglutinación que permite identificar las inmunoglobulinas IgM e IgG , la cual puede ser útil como prueba diagnóstica básica y para corroborar los resultados de otras pruebas serológicas. Al igual que la prueba de placa es de carácter cuantitativo y surge el problema de que algunos sueros caen en el nivel de sospechosos (1, 2) . Presenta limitantes tales como: no poder diferenciar Ac vacunales de aquellos producidos por infección natural ; tampoco permite detectar con exactitud Ac de infecciones recientes o estados de cronicidad y además, tiene la desventaja de que algunas veces da reacciones cruzadas con Ac dirigidos contra otros m.o. (16, 47, 48).

#### Prueba de aglutinación en tubo con 2-ME

Anderson, en 1964 ( 4 ) describe la técnica. Se utiliza el 2-ME para distinguir los diversos tipos de inmunoglobulinas. La IgM (pentámero) se puede romper cuando se reducen los puentes

disulfuro con 2-ME, cisteína o ditiotreitól y, por lo tanto la molécula pierde su actividad de Ac. La IgG es resistente a este tratamiento cuando se usan las diluciones correctas del reductor. Esta prueba tiene la ventaja de reducir el número de animales clasificados erróneamente como positivos, cuando se llevan a cabo programas de vacunación permanente. Existe el inconveniente de que tiene muy baja especificidad en animales recientemente vacunados ( 46 ) .

#### Prueba de Fijación de Complemento

Esta prueba se practica en muchos países para el diagnóstico de brucelosis y es la que ha demostrado ser más exacta y sensible. En brucelosis bovina mientras que ambos Ac (IgM e IgG) fijan el complemento, la IgG es mucho más efectiva que la IgM, en la prueba de FC. Esta prueba detecta Ac producido por la vacunación con la cepa 19 de Br. abortus hasta los seis meses posteriores a la vacunación, no así las pruebas de seroaglutinación, que continúan detectándolos durante más tiempo. En animales con infección crónica, los niveles de Ac tienden a disminuir con las pruebas de seroaglutinación, mientras que con la prueba de FC los niveles diagnósticos persisten durante más tiempo. Es una prueba excelente, sólo que para llevarla a cabo es necesario que el laboratorio cuente con personal capacitado, así como material y equipo adecuados (1, 2, 47, 49) .

### Prueba de Hemólisis Indirecta

La prueba de HI ha sido recientemente desarrollada por Plackett et al, en 1976 ( 52 ). La prueba se lleva a cabo utilizando eritrocitos sensibilizados con una preparación de LPS extraído de Br. abortus cepa 19. Los eritrocitos sensibilizados son lisados en presencia de un exceso de complemento. La importancia de esta prueba radica quizá en su habilidad para eliminar los fenómenos de prozona que ocurren en la prueba de FC ( 54 ).

### Prueba de Inmunodifusión Radial con antígeno polisacárido-B

Las pruebas rutinarias de serodiagnóstico no diferencian con precisión animales infectados de animales vacunados con la cepa 19 de Br. abortus. Debido a esto, se ha desarrollado en años recientes una prueba de inmunodifusión en gel utilizando un antígeno polisacárido obtenido a partir de cepas rugosas y lisas de Br. melitensis. Dicho antígeno ha sido denominado polisacárido-B, o bien, poli-B y, precipita en la prueba de IDR con sueros de animales infectados, pero no con los de animales vacunados con la cepa 19 de Br. abortus. La prueba de IDR utilizando poli-B puede ser aplicada a sueros de animales vacunados recientemente, lo que no es posible con otras pruebas serodiagnósticas de rutina, ya que las aglutininas posvacunales y Ac fijadores de complemento aún están presentes, y por esta razón existe un gran número de reactores positivos en dichas pruebas (19, 20, 22, 23, 32, 33, 50) .

La prueba de I/R consiste en incorporar el antígeno en el

agar y colocar el Ac específico en pozos horadados en la misma placa. El Ac se difunde en forma radial dentro del antígeno gelificado, dando lugar a la formación de un anillo de precipitación. El diámetro del anillo de precipitación crece hasta que las concentraciones de antígeno y Ac se encuentran en equilibrio (47)-

En los animales, la prevención de esta enfermedad se realiza por medio de la vacunación de bovinos hembras entre los tres y seis meses de edad, con la cepa 19 de Br. abortus, aunque existen otras cepas para la vacunación y han sido utilizadas en otros países. Debido a las diferentes tasas de prevalencia de la enfermedad en diversas regiones y países del mundo, y, aunque no siempre se realiza la vacunación en los primeros meses de edad de los animales susceptibles, se pueden presentar casos en que los animales adultos estén propensos a sufrir la enfermedad, con las correspondientes pérdidas económicas. Debido a esto desde hace algunos años se ha estudiado el efecto de la vacunación en animales adultos con dosis normal y reducida de la cepa 19 de Br. abortus, encontrando que las dos dosis son efectivas, aunque la ventajosa que la normal. Sin embargo, en bovinos adultos vacunados con dosis normal se han encontrado problemas como la infección persistente por la cepa vacunal y la interferencia en el diagnóstico serológico de la enfermedad. Al respecto, Nicoletti et al., en 1978 ( ( 49 ), encontraron que la aplicación subcutánea de la vacuna de Br. abortus cepa 19, en dosis de  $5.9 \times 10^{10}$  y  $2.95 \times 10^9$  m.o./ml a animales adultos de un hato infectado, reducía la tasa de infec-

ción de los siguientes seis meses, no habiendo encontrado una diferencia entre las dos dosis con respecto a la protección conferida y considerando que los títulos posvacunales se redujeron substancialmente cuando se utilizó la dosis reducida de la vacuna ( 1, 2 ) .

Entre las bases generales para el control y prevención de la brucelosis en bovinos se encuentra la identificación y eliminación de los animales infectados, aunado a los programas de vacunación. Particularmente en brucelosis, se presenta la necesidad de distinguir Ac producidos por infección natural, de aquellos Ac producidos por reciente vacunación con la cepa 19 de Br. abortus. Debido a esto existe una necesidad urgente de contar con una prueba diagnóstica sensible y específica, primordialmente en zonas donde la infección tiene una prevalencia alta y la vacunación de animales adultos es permitida ( 22, 32, 48 ) .

Las dificultades técnicas que ofrece el diagnóstico de esta enfermedad han creado la necesidad de desarrollar investigaciones con el fin de incrementar la eficiencia de las pruebas de laboratorio (22, 31). Díaz y Dorronsoro ( 20 ) han utilizado pruebas de inmunodifusión en gel, como contribución al diagnóstico serológico de brucelosis y versiniosis, resultando de gran utilidad para diagnósticos rápidos. En 1980, Jones et al ( 32 ) encontraron que la prueba de IDR, utilizando un antígeno polisacárido obtenido a partir de la cepa B-115 de Br. melitensis, denominado polisacárido-B, tuvo una especificidad alta (80%), en comparación con las

pruebas de tarjeta (41.9%), rivanol (42.3%) y fijación de complemento (66%) : sin embargo, su sensibilidad fué menor (87.8%) comparada con fijacion de complemento (97.6%), rivanol (99.4%) y tarjeta (100%) .

## OBJETIVOS :

1.- Evaluar y comparar la cantidad de antígeno polisacárido-B producido a partir de tres diferentes cepas de Brucella melitensis: 16-M, Rev-1 y B-115. En base a esto, a la virulencia y necesidades de crecimiento de cada cepa, determinar cuál de estas es más adecuada para la extracción del polisacárido-B que se utilizará en subsecuentes trabajos de investigación.

2.- Determinar la efectividad de los polisacáridos-B obtenidos de las diferentes cepas de Brucella melitensis, utilizando la prueba de Inmunodifusión Radial para diferenciar bovinos infectados de bovinos vacunados tanto con dosis completa ( $9 \times 10^9$  m.o./ml) como con dosis reducida ( $3 \times 10^{10}$  m.o./ml) de la cepa 19 de Brucella abortus .

## MATERIAL Y METODOS

El experimento fue llevado a cabo en dos fases :

I.- La primera consistió en la obtención y comparación en cuanto al rendimiento de los polisacáridos-B de tres diferentes cepas de Br. melitensis : 16-M. Rev-1 y B-115 .

II.- En la segunda fase se evaluó la efectividad diagnóstica de los tres polisacárido-B obtenidos utilizándolos en la prueba de IDR para diferenciar bovinos infectados, de aquellos animales vacunados con la cepa 19 de Br. abortus .

Fase I : extracción de los polisacáridos-B de tres cepas diferentes de Br. melitensis .

Fundamento : la obtención del polisacárido-B de cada cepa se realizó utilizando ácido tricloroacético (ATA) 0.5M para la desproteí-  
nización de la muestra y los complejos de polisacáridos solubles en ácido se precipitaron con etanol frío al 95% .

Se utilizaron tres cepas de Br. melitensis (provenientes del cepario del Departamento de Bacteriología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias-S.A.R.H.), dos de ellas lisas (16-M y Rev-1) . y una rugosa (B-115)  
Las diferentes cepas de Br. melitensis fueron cultivadas individualmente, según la técnica descrita por Alton et al ( 1 ), en rascos de Roux conteniendo medio sólido de TSA ; se incubaron durante 48hrs a 37°C en una estufa bacteriológica. para cosecharse



posteriormente con Solución Salina Fisiológica (SSF). La suspensión obtenida fue colocada en tubos de centrifuga con tapón de rosca y se centrifugó a 5000 X gravedades (g) durante 30 minutos (min). Se lavó el paquete celular en dos ocasiones con SSF, para posteriormente determinar el peso del paquete celular y hacer una suspensión al 20% en agua desionizada. Se adicionó a esta suspensión un volumen equivalente de ATA 0.5M, manteniéndose el volumen total resuspendido bajo agitación magnética constante durante 18hrs a 4°C. La suspensión fue centrifugada nuevamente a 5000 X g durante 10min, obteniéndose únicamente el sobrenadante que fue ajustado a un pH de 6.5 con hidróxido de sodio (NaOH) 1M ; se adicionaron cinco volúmenes de etanol frío al 95% y se dejó en reposo durante toda la noche a 4°C, para propiciar la precipitación del antígeno. El material precipitado se centrifugó a 5000 X g durante 10 min y el sedimento fue resuspendido al 10% en agua desionizada, ajustándose el pH a 7.0 con NaOH 0.1M. Esta suspensión final fué sometida a un proceso de diálisis durante cinco días, empleando agua desionizada a 4°C, la cual fué cambiada cada cinco hrs. Con la finalidad de eliminar cualquier material insoluble, el producto obtenido se centrifugó a 10,000 X g durante 30min, considerando al sobrenadante como el antígeno polisacárido-B.

Se empleó el mismo método para la extracción del antígeno de cada cepa utilizada, realizándose tres repeticiones para la obtención de polisacárido-B a partir de las diferentes cepas de

Br. melitensis .

El paquete celular húmedo de cada una de las cepas fue ajustado, en cada extracción, a un mismo peso con el fin de poder establecer una comparación real del rendimiento en la producción de polisacárido-B de cada cepa .

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACION DE POLISACARIDO-B A PARTIR DE CADA CEPA DE Br. melitensis

Fundamento : este método es útil en la identificación y cuantificación de azúcares simples, oligosacáridos, polisacáridos y sus derivados con grupos reductores libres o potencialmente libres. Es ventajoso ya que no requiere de hidrólisis previa. Al adicionar ácido sulfúrico concentrado se forman productos de hidrólisis de carbohidratos, como derivados furfurólicos, que se combinan con fenoles para formar compuestos coloridos.

La cuantificación de poli-B contenido en cada mililitro (ml) de solución de los diferentes antígenos se realizó siguiendo la técnica descrita por Dubois et al en 1956 ( 24 ), la cual se describe en la Tabla No. 2 .

Todos los tubos se dejaron en reposo por 10min y posteriormente se mantuvieron en baño maría con agitación entre 25 y 30°C, durante 15min. Las lecturas fueron realizadas en el espectrofotómetro (Spectronic-20 de Bauscn and Lomb), utilizando una longitud de onda de 490nanómetros (nm). Todas las determinaciones se realizaron

TABLA No. 2.

CUANTIFICACION DE POLISACARIDO - B EN BASE A LA TECNICA DE DUBOIS.

Tubo	Patrón de Glucosa (1 mg / ml) (ml)	Agua Destilada (ml)	Fenol al 5% (ml)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 95.5% (ml)	Solución Problema Poli-B (ml)
1	-	1000	0.5	2.5	-
2	10	990	0.5	2.5	-
3	20	980	0.5	2.5	-
4	30	970	0.5	2.5	-
5	40	960	0.5	2.5	-
6	50	950	0.5	2.5	-
7	60	940	0.5	2.5	-
8	70	930	0.5	2.5	-
9	-	-	0.5	2.5	1
10	-	-	0.5	2.5	1
11	-	-	0.5	2.5	1
12	-	-	0.5	2.5	1

por duplicado .

El análisis estadístico utilizado para la comparación del rendimiento en la producción de polisacárido-B a partir de las tres diferentes cepas de Br. melitensis fue : Análisis de Varianza (ANDEVA) y prueba de significancia de Tukey ( 59 )

Fase II : evaluación de la efectividad de los polisacáridos-B

A) Selección de muestras : se examinaron un total de 62 sueros de bovinos, a los que se les realizaron las siguientes pruebas serológicas de rutina, siguiendo la técnica descrita por Alton et al ( 1 ), con el fin de determinar la presencia de Ac contra brucela :

- i) Prueba de Tarjeta
- ii) Prueba de aglutinación lenta en tubo
- iii) Prueba de aglutinación con 2-Mercaptoetanol (2-ME)

Fundamento de las pruebas de Aglutinación Directa (entre las que se incluyen las pruebas de : tarjeta, aglutinación en tubo y aglutinación con 2-ME) : es una reacción antígeno-anticuerpo, en la cual un antígeno celular (brucela) o de partículas insolubles es aglutinado directamente por el Ac (en ese caso la IgM es 750 veces más eficiente que la IgG). La aglutinación directa es relativamente independiente de la temperatura, excepto para los Ac que reaccionan en frío, como las crioaglutininas (47, 56)

Prueba del Antígeno Brucelar Amortiguado o de Tarjeta

El antígeno brucelar amortiguado utilizado para la reacción de esta prueba consiste en una suspensión de Br. abortus cepa 1119-3 en una concentración del 8%, en un amortiguador de lactato a un pH de 3.5±0.05 y teñida con Rosa de Bengala \* .

Se sacaron los sueros problema, sueros control y antígeno del refrigerador y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 30-60min antes de realizar la prueba. Se depositó una gota de 0.03ml de cada uno de los sueros sobre una placa de cristal y posteriormente, con un gotero calibrado, se depositó una gota de 0.03ml del antígeno a un lado de la gota de suero. Se mezcló perfectamente utilizando un agitador y se imprimió un ligero movimiento de vaivén. La lectura de la prueba se realizó 4min después utilizando un aglutinoscopio, en donde la lectura se hizo con la luz indirecta que tiene dicho aglutinoscopio (1, 46)

Resultado de la prueba : ( - ) = No aglutinación

( + ) = Cualquier grado de aglutinación

Prueba de Aglutinación Lenta en Tubo

El antígeno que se utiliza es de Br. abortus cepa 1119-3, sin teñir y a una concentración de 4.5% \* .

Para la realización de la prueba fué necesario diluir la suspensión del antígeno original a una concentración celular equivalente al 0.045%, al utilizar el método de la dilución decimal, y esta dilución debe realizarse cuando menos 12hrs antes de utilizarse.

\* Donado por : National Animal Disease Center, Ames, Iowa, U.S.A.

El antígeno debe diluirse 1:100 utilizando SSF adicionada de 0.5% de fenol, con el objeto de reducir la presencia del fenómeno de prozona.

Método de la dilución decimal : se emplearon cuatro tubos de vidrio (Pyrex de 13 X 100mm) por cada muestra de suero, que correspondieron a las siguientes diluciones : 1:25, 1:50, 1:100, y 1:200. Se identificó el primer tubo de cada una de las muestras y se depositaron en el fondo de este 0.08ml del suero correspondiente, utilizando una pipeta de Bang. La operación fue repetida con los siguientes tubos depositando 0.04ml en el segundo, 0.02ml en el tercero y finalmente, en el último tubo 0.01ml. Con una jeringa automática se depositaron 2ml del antígeno diluido 1:100 dentro de cada tubo. Los tubos fueron agitados en la misma gradilla para lograr la homogeneización de las muestras. Se utilizaron los sueros control positivo y negativo \* Las muestras fueron incubadas a 37°C en la estufa bacteriológica durante 48hrs para posteriormente leer los resultados .

La lectura de los resultados se hizo observando los tubos contra un fondo negro mate, con la luz situada detrás de ellos.

Interpretación de los resultados :

( + ) = hay reacción positiva cuando la mezcla de suero y antígeno es clara y una leve agitación no disgrega los flóculos.

( i ) = hay reacción incompleta cuando la mezcla de suero y antígeno es parcialmente clara y una agitación leve no disgrega los flóculos.

( - ) = hay reacción negativa cuando la mezcla de suero y antígeno no muestra claridad alguna y la agitación leve no revela la presencia de flóculos .

El título de Ac se expresa como el inverso de la dilución más alta en la que se observa aglutinación .

#### Prueba de Aglutinación con 2-Mercaptoetanol

Se requirió del mismo equipo empleado para realizar la prueba de aglutinación en tubo, pero el antígeno fue diluido 1:50 en SSF sin fenol.

Se preparó una solución 0.1M de 2-ME agregando 0.714ml de 2-mercaptoetanol a 99.286ml de SSF sin fenol. Tanto los sueros problema, como los sueros control fueron diluidos por el método de dilución decimal (0.08ml, 0.04ml, 0.02ml y 0.01ml) del suero correspondiente y posteriormente se colocó 1ml de la solución 0.1M de 2-ME. Se incubaron a 37°C por una hora y se llevó a cabo la lectura siguiendo el mismo criterio empleado para la prueba de aglutinación en tubo . La prueba es interpretada por la diferencia en títulos antes y después del tratamiento con el reductor. Títulos de 100 antes y 25 después es indicativo de que solo en Ac presente es IgM, lo que no nos indica infección. Sin embargo, títulos iguales antes y después del tratamiento, por bajos que sean, sí nos indican infección. En caso de que sean títulos bajos es conveniente repetir la prueba a los treinta días .

Todos los sueros fueron clasificados dentro de cuatro grupos, los cuales estuvieron constituidos de la siguiente manera :

a) Grupo I : se incluyeron 15 sueros de animales sospechosos de una infección por Brucella, en base a las pruebas serológicas realizadas con anterioridad.

b) Grupo II : estuvo constituido por 15 sueros de bovinos vacunados en edad adulta (más de 12 meses de edad) con dosis reducida ( $3 \times 10^9$  m.o./ml) de la cepa 19 de Br. abortus .

c) Grupo III : estuvo constituido por 15 sueros de bovinos vacunados entre los tres y seis meses de edad con la dosis completa ( $9 \times 10^{10}$  m.o./ml) de la cepa 19 de Br. abortus .

d) Grupo IV : se incluyeron 15 sueros de animales sin antecedentes de vacunación con la cepa 19 de Br. abortus y negativos a las pruebas serodiagnósticas previamente realizadas.

Además se trabajó con dos sueros control : uno positivo y uno negativo \*

B) Evaluación de la efectividad de los antígenos obtenidos. Se empleó la prueba de IDR utilizando los polisacáridos-B obtenidos de las cepas : 16-M, Rev-1 y B-115 de Br. melitensis .

Fundamento : la inmunodifusión en gel puede definirse como una reacción de precipitación en un medio semisólido. La precipitación es una reacción entre un antígeno soluble y un Ac también soluble, en la cual se forma una malla compleja de formas de conjuntos entrelazados .

\* Donado por : National Animal Disease Center, Ames, Iowa, U.S.A.



Aunque la formación de complejos antígeno-Ac en un medio semisólido como el agar depende de electrolitos amortiguadores, pH y temperatura, los determinantes más importantes de la reacción son las concentraciones relativas de antígeno y Ac .

El gel fue preparado disolviendo agarosa al 1.6% (Bioxón de México, grado bacteriológico) en 6ml. de amortiguador Glicina-NaOH 0.1M pH=8.6, en un vaso de precipitados de 50ml. Por otro lado los polisacáridos-B de cada una de las cepas de Br. melitensis se colocaron también en 6ml del mismo amortiguador, al que previamente se le había adicionado una concentración del 20% de NaCl, para obtener una concentración final de poli-B entre 40-42mcg/ml de gel ( 22 ) . Posteriormente se mezclaron volúmenes equivalentes del gel y cada una de las soluciones de poli-B, ambos a 65°C en baño maría y se depositaron 4ml de la mezcla en cajas petri de vidrio (con un diámetro de 5.5cm), colocadas sobre una superficie plana. Se dejaron solidificar los geles, quedando con un espesor de 2mm para posteriormente marcar los pozos utilizando un patrón y eliminando el agar por medio de una pipeta Pasteur conectada a una bomba de vacío (21, 46) .

Se utilizaron un total de 3 placas de agarosa por cada poli-B probado, contando cada una de ellas con 21 pozos. Los sueros fueron depositados en los pozos utilizando una pipeta automática (Quickpette, Helena Laboratories 10-50mcl), colocando 20mcl en cada pozo. En cada placa se incluyeron 19 sueros problema un control positivo y un negativo. La lectura se realizó después de 24hrs de incubación a 37°C, observando la formación de halos.

Aunque la formación de complejos antígeno-Ac en un medio semisólido como el agar depende de electrolitos amortiguadores, pH y temperatura, los determinantes más importantes de la reacción son las concentraciones relativas de antígeno y Ac .

El gel fue preparado disolviendo agarosa al 1.6% (Bioxón de México, grado bacteriológico) en 6ml de amortiguador Glicina-NaOH 0.1M pH=8.6, en un vaso de precipitados de 50ml. Por otro lado los polisacáridos-B de cada una de las cepas de Br. melitensis se colocaron también en 6ml del mismo amortiguador, al que previamente se le había adicionado una concentración del 20% de NaCl, para obtener una concentración final de poli-B entre 40-42mcg/ml de gel ( 22 ) . Posteriormente se mezclaron volúmenes equivalentes del gel y cada una de las soluciones de poli-B, ambos a 65°C en baño maría y se depositaron 4ml de la mezcla en cajas petri de vidrio (con un diámetro de 5.5cm), colocadas sobre una superficie plana. Se dejaron solidificar los geles, quedando con un espesor de 2mm para posteriormente marcar los pozos utilizando un patrón y eliminando el agar por medio de una pipeta Pasteur conectada a una bomba de vacío (21, 46) .

Se utilizaron un total de 3 placas de agarosa por cada poli-B probado, contando cada una de ellas con 21 pozos. Los sueros fueron depositados en los pozos utilizando una pipeta automática (Quickpette, Helena Laboratories 10-50mcl), colocando 20mcl en cada pozo. En cada placa se incluyeron 19 sueros problema un control positivo y un negativo. La lectura se realizó después de 24hrs de incubación a 37°C. observando la formación de halos.

## RESULTADOS

Fase I : extracción de los polisacáridos-B de tres diferentes cepas de Br. melitensis .

Las cantidades de antígeno polisacárido-B (mcg/ml) obtenido a partir de cada una de las cepas de Br. melitensis utilizadas en este trabajo fueron determinadas en base a una curva estándar de glucosa, realizando un total de tres repeticiones para cada cepa (Gráfica No. 1) .

Cuando se llevó a cabo la extracción de polisacárido-B de las tres cepas de Br. melitensis a partir de un peso de 3.8gr de paquete celular húmedo, el volumen final obtenido para cada antígeno fue de 7.5ml ; al utilizar como peso inicial 5.2gr se obtuvieron 14ml y 27ml para cada antígeno cuando se utilizaron 6.6gr de paquete celular húmedo.

La cantidad total de polisacárido-B (mcg), referida al volumen final obtenido para cada antígeno se muestra en la Tabla No. 3 . La cantidad promedio de polisacárido-B obtenida a partir de las cepas lisas de Br. melitensis (16-M y Rev-1) resultó ser casi tres veces mayor a la obtenida a partir de la cepa rugosa (B-115) , Tabla No. 4 .

El análisis estadístico utilizado para realizar la comparación en cuanto al rendimiento de polisacárido-B obtenido a partir de cada cepa de Br. melitensis no mostró diferencia estadísticamente significativa entre las cepas lisas (16-M y Rev-1), sin

embargo, al comparar estas dos con la cepa rugosa (B-115) si se encontró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). En la Tabla No.4 se muestran los resultados del análisis estadístico realizado para la comparación del rendimiento obtenido de los tres polisacáridos-B. En la Tabla No. 4a se muestra el desarrollo del análisis estadístico

Fase II : evaluación de la efectividad de los tres polisacáridos-B.

La información correspondiente al comportamiento de los 62 sueros de bovinos muestreados (divididos en 4 grupos), tanto en las pruebas serológicas de rutina, como en la prueba de IDR utilizando los tres polisacáridos-B obtenidos, se presenta en las Tablas 5, 6, 7 y 8 .

Por lo que respecta al Grupo I (sueros de animales sospechosos a una infección por *Brucella*), del total de 15 animales, 12 fueron positivos a la prueba de aglutinación con 2-ME, presentando título de 200 y un animal con un título de 100, resultando estos 13 sueros positivos a la prueba de IDR con los tres diferentes polisacáridos-B , Tabla No. 5 .

Es importante notar que el total de animales vacunados con dosis reducida ( $3 \times 10^9$  m.o./ml) de la cepa 19 de Br. abortus (Grupo II) resultaron positivos a la prueba de aglutinación en tubo, presentando diferentes títulos, sin embargo, únicamente cuatro de ellos fueron positivos a la prueba de aglutinación con 2-ME, presentando títulos hasta de 50. Todos los animales

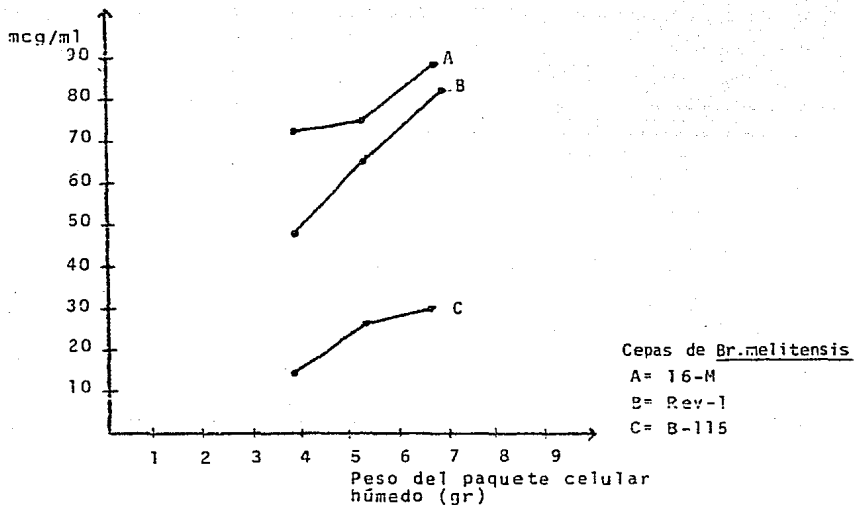
de este grupo resultaron negativos en la prueba de IDR con los tres polisacáridos-B, Tabla No. 6 .

En el grupo de animales vacunados con dosis normal (9 X 10<sup>10</sup> m.o./ml) de la cepa 19 de Br. abortus (Grupo III), los animales No. 9 y No. 11 resultaron positivos en la prueba de IDR (se observó la aparición de un halo de precipitación). Los sueros de estos dos animales fueron también positivos a las pruebas de seroaglutinación realizadas, presentando títulos elevados (200), Tabla No. 7 .

En el Grupo IV (animales sin antecedentes de vacunación) no se encontraron reactores positivos tanto en las pruebas de rutina, como en la prueba de IDR utilizando los tres polisacáridos-B.

El suero control positivo presentó títulos de 200 en todas las pruebas serológicas realizadas y pudo observarse la formación de un halo de precipitación en la prueba de IDR con los polisacáridos-B obtenidos de las tres cepas de Br. melitensis .

Todos estos resultados, expresados en porcentajes, se muestran en las Tablas No. 9 (resultados de las pruebas serodiagnósticas de rutina) y No. 10 (resultados de la prueba de IDR), para los cuatro grupos de bovinos muestreados.



Gráfica No. 1 . CANTIDAD DE ANTIGENO POLISACARIDO-B (mcg/ml) OBTENIDA A PARTIR DE TRES CEPAS DE Brucella melitensis .

TABLA NO. 3.

CANTIDAD TOTAL DE ANTIGENO POLISACARIDO - B (mcg) REFERIDA AL VOLUMEN FINAL OBTENIDO PARA LAS TRES CEPAS DE Brucella melitensis UTILIZADAS.

Experimento No.	Peso del paquete celular húmedo (gr).	Cepas de <u>Br. melitensis</u>		
		16-M	Rev-1	B-115
1	3.8	544.5	360.0	109.5
2	5.2	1058.4	918.4	375.2
3	6.6.	2397.6	2235.6	815.4

TABLA NO. 4.

COMPARACION DE TRES CEPAS DE Brucella melitensis EN CUANTO A SU RENDIMIENTO EN LA PRODUCCION DE POLISACARIDO - B A PARTIR DE 1 gr. DE PAQUETE CELULAR HUMEDO.

Cepas de <u>Br. melitensis</u>	No. de Repeticiones	Cantidad promedio de Polisacárido-B (mcg)	Desviación estándar
16-M	3	236.6 a*	113.6
Rev-1	3	202.3 a*	123.7
B-115	3	74.7 b*	47.6

\* a, b. Valores con distinta literal son estadísticamente diferentes. (P<0.05) en la prueba de Tukey.



Tabla No. 4a .

ANALISIS DE VARIANZA (ANDEVA) . CLASIFICACION SIMPLE .

TABLAS					
FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD (GL)	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	Fcalculada	F.95,2,651
TRATAMIENTOS	(a-1) = 2	30722.3	15361.15	15.38	5.14
ERROR (Diferencia)	(n-1)=6	5991.4	998.5		
TOTAL	(an-1)=8	36713.7			

Donde : a = Número de muestras o tratamientos = 3  
 n = Número de repeticiones para cada muestra = 3

$$F = \frac{\text{Varianza entre muestras}}{\text{Varianza del error}} = \frac{15361.15}{998.5} = 15.38$$

$$\text{Varianza} = CM = \frac{\text{Suma de cuadrados}}{\text{Grados de Libertad}} \quad \text{Para Tratamientos} = \frac{30722.3}{2} = 15361.15$$

$$\text{Para Error} = \frac{5991.4}{6} = 998.5$$

INTERPRETACION DEL ANDEVA :

Quando son varias las muestras y por tanto hay varias medias, la hipótesis de nulidad  $H_0$  y la hipótesis alternativa  $H_A$  son :

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \dots \mu_a$$

$$H_A : \mu_1 \neq \mu_2 \neq \dots \mu_a \quad (\text{o al menos un par de } \mu \text{ son } \neq)$$

Si  $F_{calculada} > F_{tablas} \rightarrow$  Entonces se rechaza  $H_0$  y se acepta la alternativa  $H_A$

Así tenemos que :

$$15.38 > F_{0.05, 2, 6} = 5.14$$

Por lo tanto la hipótesis  $H_0$  se rechaza .

Comparaciones Múltiples por el Método de Tukey .

$$W = q_{\alpha} S_x$$

en donde :

$$S_x = \text{error estándar de la media} = \sqrt{\frac{S^2}{n}}$$

$$S^2 = \text{CM o varianza del error experimental}$$

$$n = \text{número de repeticiones para calcular medias}$$

$$q_{\alpha} = \text{valor tabular, que es un valor de } t \text{ modificado.}$$

$$q_{0.05, 3, 6, 91} = 4.34$$

$$S_x = \sqrt{\frac{998.5}{3}} = 18$$

$$W = 4.34 ( 18 ) = 78.12$$

Cera de Br. melitensis

16-M	$\bar{X}_1 = 236.6$
Rev-1	$\bar{X}_2 = 202.3$
B-115	$\bar{X}_3 = 74.07$

- 1.-  $\bar{X}_1 - \bar{X}_2$        $D_1 = 236.6 - 202.3 = 34.300 < 78.12$   
2.-  $\bar{X}_1 - \bar{X}_3$        $D_2 = 236.6 - 74.07 = 162.53 > 78.12$   
3.-  $\bar{X}_2 - \bar{X}_3$        $D_3 = 202.3 - 74.07 = 128.23 > 78.12$

Interpretación de la prueba de Tukey :

Si  $D$  (diferencia entre medias)  $\geq q \cdot S_x$ , la diferencia se debe considerar significativa si  $\alpha=0.05$ . En caso contrario las medias deben considerarse iguales o equivalentes, o la diferencia observada estima a cero, y por lo tanto, es estadísticamente no significativa.

GRUPO	X
1	236.6a*
2	202.3a*
3	74.07b*

\* Medias con distinta letra son estadísticamente diferentes.

TABLA No. 5

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS SEROLOGICAS DE RUTINA Y DE LA PRUEBA DE INMUNODIFUSION RADIAL EN EL GRUPO I:  
ANIMALES SOSPECHOSOS A UNA INFECCION POR BRUCELLA.

GRUPO I: Animales sospechosos No. de suero	P R U E B A			D I A G N O S T I C A		
	Tarjeta	Aglutinación en tubo	Aglutinación con 2-ME	Inmunodifusión Radial		
				16-M	Rev-1	B-115
1	+	+ 200	i 200	+	+	+
2	+	+ 200	i 200	+	+	+
3	+	+ 200	+ 200	+	+	+
4	+	+ 200	+ 200	+	+	+
5	+	+ 200	+ 200	+	+	+
6	+	+ 200	+ 200	+	+	+
7	+	+ 200	i 200	+	+	+
8	+	+ 200	+ 200	+	+	+
9	+	+ 200	+ 200	+	+	+
10	+	+ 200	i 25	-	-	-
11	+	+ 200	i 200	+	+	+
12	+	+ 200	+ 200	+	+	+
13	+	+ 200	+ 200	+	+	+
14	+	i 100	i 25	-	-	-
15	+	+ 200	+ 200	+	+	+

+ = Aglutinación o precipitación completa

i = Aglutinación incompleta.

- = No se observa ningún grado de aglutinación o precipitación.

Criterio de lectura: El título se expresa como el inverso de la dilución más alta en la que se observa aglutinación.

TABLA No. 6

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS SEROLOGICAS DE RUTINA Y DE LA PRUEBA DE INMUNODIFUSION RADIAL EN EL GRUPO II:  
ANIMALES VACUNADOS CON DOSIS REDUCIDA  $3 \times 10^9$  m.o./ml DE LA CEPA 19 DE Brucella abortus.

GRUPO II: Animales vacunados con dosis reducida. no. de suero	P R U E B A D I A G N O S T I C A					
	Tarjeta	Aglutinación en tubo	Aglutinación con 2-ME	Inmunodifusión Radial		
				16-M	Rev-1	B-115
1	-	+ 50	-	-	-	-
2	-	+ 50	-	-	-	-
3	+	+ 50	+ 25	-	-	-
4	+	+ 50	+ 25	-	-	-
5	+	+ 200	+ 50	-	-	-
6	-	+ 50	-	-	-	-
7	-	+ 25	-	-	-	-
8	+	+ 50	+ 25	-	-	-
9	+	+ 100	+ 50	-	-	-
10	+	+ 200	+ 50	-	-	-
11	+	+ 200	+ 50	-	-	-
12	-	+ 25	-	-	-	-
13	+	+ 50	-	-	-	-
14	-	+ 25	-	-	-	-
15	-	+ 25	-	-	-	-

+ = Aglutinación y precipitación completa.

i = Aglutinación incompleta.

- = No se observa ningún grado de aglutinación o precipitación.

Criterio de lectura: El título se expresa como el inverso de la dilución más alta en la que se observa aglutinación.

TABLA No. 7.

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS SEROLOGICAS DE RUTINA Y DE LA PRUEBA DE INMUNODIFUSION RADIAL EN EL GRUPO III:  
ANIMALES VACUNADOS CON DOSIS NORMAL  $9 \times 10^{10}$  m.o./ml DE LA CEPA 19 DE Brucella abortus.

GRUPO III: Animales vacunados con dosis normal. No. de suero	P R U E B A D I A G N O S T I C A					
	Tarjeta	Aglutinación en tubo	Aglutinación con 2-ME	Inmunodifusión Radial 16-M Rev-1 B-115		
1	+	-	-	-	-	-
2	-	+ 25	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	+	+ 25	-	-	-	-
6	-	+ 50	-	-	-	-
7	+	-	-	-	-	-
8	+	+ 50	-	-	-	-
9	+	+ 200	+ 200	+	+	+
10	+	+ 50	+ 25	-	-	-
11	+	+ 200	+ 200	+	+	+
12	+	+ 50	1 50	-	-	-
13	-	+ 25	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-
15	-	+ 25	-	-	-	-

+ = Aglutinación o precipitación completa.

i = Aglutinación incompleta.

- = No se observa ningún grado de aglutinación o precipitación.

Criterio de lectura: El título se expresa como el inverso de la dilución más alta en la que se observa aglutinación.

TABLA No. 8.

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS SEROLOGICAS DE RUTINA Y DE LA PRUEBA DE INMUNODIFUSION RADIAL EN EL GRUPO IV:  
ANIMALES SIN ANTECEDENTES DE VACUNACION, INCLUYENDO LOS CONTROLES POSITIVO Y NEGATIVO.

GRUPO IV: Animales no vacunados No. de suero	P R U E B A D I A G N O S T I C A					
	Tarjeta	Aglutinación en tubo	Aglutinación con 2-ME	Inmunodifusión Radial		
				16-M	Rev-1	B-115
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-
Control (+)	+	+ 200	+ 200	+	+	+
Control (-)	-	-	-	-	-	-

+ = Aglutinación o precipitación completa.

- = Ningún grado de aglutinación.

Criterio de lectura: El título se expresa como el inverso de la dilución más alta en la que se observa aglutinación.

TABLA NO. 9

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS SEROLOGICAS EXPRESADOS EN PORCENTAJES (%) EN LOS CUATRO GRUPOS DE BOVINOS MUESTREADOS, INCLUYENDO LOS CONTROLES RESPECTIVOS.

GRUPO	Tajeta		Aglutinación en Tubo				Aglutinación con 2-ME					
	-	+	-	+25	+50	+100	+200	-	+25	+50	+100	+200
I	-	100	-	-	-	6.6	93.4	-	13.3	-	6.6	80.0
II	46.6	53.3	-	26.6	46.6	6.6	20.0	53.3	20.0	26.6	-	-
III	46.6	53.3	33.3	20.0	33.3	-	13.3	66.6	13.3	6.6	-	13.3
IV	100	-	100	-	-	-	-	100	-	-	-	-
C+	-	100	-	-	-	-	100	-	-	-	-	100
C-	100	-	100	-	-	-	-	100	-	-	-	-

C + = Control positivo

C - = Control negativo.



TABLA NO. 10

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE INMUNODIFUSION RADIAL EXPRESADOS EN PORCENTAJES (%) EN LOS CUATRO GRUPOS DE BOVINOS MUESTREADOS, INCLUYENDO LOS CONTROLES RESPECTIVOS.

GRUPO	INMUNODIFUSION RADIAL					
	16-M		REV-1		B-115	
	-	+	-	+	-	+
I	13.3	86.6	13.3	86.6	13.3	86.6
II	100	-	100	-	100	-
III	86.6	13.3	86.6	13.3	86.6	13.3
IV	100	-	100	-	100	-
Control (+)	-	100	-	100	-	100
Control (-)	100	-	100	-	100	-

## DISCUSION

En estudios previos (22, 32), diversos autores, utilizando el método empleado en el presente trabajo para la extracción de polisacárido-B a partir de la cepa B-115 de Br. melitensis, han demostrado que dicho antígeno precipita en la prueba de IDR única\_mente con sueros de animales infectados.

En 1981, Díaz et al ( 23 ), concluyen que el polisacárido- B obtenido a partir de la cepa lisa de Br. melitensis 16-M es inmuno\_ lógicamente indistinguible del polisacárido-B obtenido de la cepa rugosa B-115 y del polisacárido-B presente en la fracción 5 de Redfearn.

Ontiveros y Tenorio, en 1984 ( 50 ), utilizando la cepa lisa de Br. melitensis Rev-1 para la obtención de polisacárido-B, demues\_ tran que dicho antígeno puede ser utilizado en la prueba de IDR para diferenciar bovinos infectados en forma natural, de aquellos animales vacunados con la cepa 19 de Br. abortus .

Sin embargo, hasta el momento no se había llevado a cabo una comparación entre las diferentes cepas de Br. melitensis (lisas: 16-M y Rev-1, y rugosas: B-115), bajo condiciones similares de experimentación (pesos constantes de paquete celular para cada cepa y un mismo método de extracción y cuantificación para dicho polisacárido), con la finalidad de evaluar cuál de ellas produce una mayor cantidad de antígeno polisacárido-B, utilizado en la prueba de IDR para el diagnóstico de brucelosis bovina.

En la Tabla No. 4 puede apreciarse que la cantidad (mcg) de polisacárido-B obtenida a partir de las cepas lisas de Br. melitensis (16-M y Rev-1) fue mucho mayor que la producida por la cepa rugosa B-115. Al respecto, Díaz et al en 1979 ( 22 ), encuentran diferencias importantes en cuanto al rendimiento de polisacárido-B obtenido a partir de dos cepas de Br. melitensis notifican un rendimiento del 1.5% para la cepa 16-M, contra un 0.5% obtenido de la cepa B-115, lo que concuerda con los resultados obtenidos en el presente trabajo, en el que se encontró que las cepas lisas 16-M y Rev-1 tuvieron un rendimiento en la producción de polisacárido-B casi tres veces mayor que el de la cepa rugosa B-115 de Br. melitensis . Es importante aclarar que no fue posible hacer la comparación de nuestros resultados en base al rendimiento, expresado en porcentaje, con los resultados reportados por otros autores, ya que notifican porcentajes en cuanto a rendimiento en base a peso seco de paquete celular, mientras que en el presente trabajo el rendimiento fue calculado en base al peso húmedo de bacterias.

Díaz y Levieux, en 1972 ( 21 ), demuestran que la cepa B-115 de Br. melitensis pierde su habilidad para sintetizar polisacárido-B después de repetidos subcultivos. Este quizá haya sido un factor importante en los resultados obtenidos en este trabajo, ya que la cepa B-115 de Br. melitensis utilizada para la extracción del antígeno tenía ya varios pases, y la cantidad total de polisacárido-B obtenida fue mucho menor que la producida a

partir de cepas lisas (16-M y Rev-1).

En lo que respecta a la evaluación de la efectividad de los diferentes polisacáridos-B al ser utilizados en la prueba de IDR, Díaz et al. en 1979 ( 22 ), utilizando polisacárido-B obtenido a partir de la cepa 16-M de Br. melitensis en dicha prueba, notifican un 78.3% de reactores positivos en animales sospechosos a una infección por Brucella ; 88.6% de positivos en animales infectados experimentalmente con una cepa virulenta de Br. abortus, aunque en animales vacunados tanto con dosis reducida ( $5 \times 10^9$  m.o./ml), como con dosis completa ( $9 \times 10^{10}$  m.o./ml) de la cepa 19 de Br. abortus no encontraron reactores positivos.

Angulo y Villa, en 1985 ( 5 ), probando 342 sueros de bovinos revacunados con una dosis reducida de la cepa 19 de Br. abortus encontraron un 2.33% de reactores positivos en la prueba de IDR, utilizando polisacárido-B obtenido a partir de la cepa 16-M de Br. melitensis. Los datos anteriores van de acuerdo con este trabajo en el que se obtuvo un porcentaje alto de reactores positivos en el grupo I de los animales muestreados (sospechosos a una infección por Brucella), pero no se observó ningún reactor positivo en la prueba de IDR dentro del grupo II (animales vacunados con dosis reducida  $3 \times 10^9$  m.o./ml de la cepa 19 de Br. abortus ).

Empleando el polisacárido-B extraído de la cepa B-115 de Br. melitensis, Jones et al., en 1980 ( 31 ), encontraron un 90.3% de reactores positivos a la prueba de IDR en sueros de animales en los que se demostró, por aislamiento, infección por Br. abortus;

en animales vacunados con dosis normal ( $7.8 \times 10^{10}$  m.o./ml) se presenta un 4.3% de positivos y ningún reactor positivo en el grupo de animales vacunados con dosis reducida ( $5 \times 10^9$  m.o./ml) de la cepa 19 de Br. abortus. Como puede observarse en el cuadro No. 10 en este trabajo se encontraron resultados similares, ya que únicamente se detectaron reactores positivos en los siguientes grupos: grupo I (animales sospechosos a una infección por Brucella con un 88.6% y grupo III (animales vacunados con dosis normal  $9 \times 10^{10}$  m.o./ml) con un porcentaje mucho más bajo de 13.3%. Es importante señalar que los dos animales del grupo III que resultaron positivos a la prueba de IDR con los tres diferentes polisacáridos-B presentaron títulos muy altos (200), tanto en la prueba de aglutinación en tubo, como en la prueba de aglutinación con 2-ME, por lo que se piensa que estos animales estaban de alguna manera infectados, ya sea por la propia cepa vacunal (lo que pudo deberse a un mal manejo de la vacuna), o bien, con una cepa de campo.

Por otro lado, Ontiveros y Tenorio, en 1984 ( 50 ), utilizando polisacárido-B obtenido a partir de la cepa lisa de Br. melitensis Rev-1, encuentran un 94% de reactores positivos en un grupo de animales infectados, mientras que sólo un 11% de reactores positivos en animales vacunados con dosis normal ( $9 \times 10^{10}$  m.o./ml) y un 3% de positivos en animales vacunados con dosis reducida ( $4.5 \times 10^8$  m.o./ml) de la cepa 19 de Br. abortus. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en este trabajo, ya que el porcentaje

más alto de reactores positivos se encontró en el grupo I. (animales sospechosos a una infección por *Brucella*) de los animales muestreados.

No se encontraron diferencias importantes en cuanto a la utilidad de los tres polisacáridos-B en la prueba de IDR para el diagnóstico de brucelosis bovina, ya que los resultados obtenidos con los tres antígenos fueron similares, es decir, en el caso de animales infectados se observó la formación de un halo de precipitación en las tres placas de IDR, sin embargo, en la placa impregnada con el polisacárido-B extraído a partir de la cepa B-115 de Br. melitensis los halos de precipitación fueron menos aparentes, en comparación con los presentados por las cepas 16-M y Rev-1 .

Las cepas lisas (16-M y Rev-1) de Br. melitensis tuvieron un crecimiento más abundante en cultivo, en comparación con la cepa rugosa B-115. Las cepas lisas presentaron un rendimiento similar en cuanto a la producción de polisacárido-B. sin embargo, es importante tomar en cuenta que la cepa Rev-1 es vacunal (bacterias vivas-atenuadas), lo que le confiere menores riesgos para su manipulación en el laboratorio, a diferencia de las cepas 16-M (lisa) y B-115 (rugosa), las cuales debido a su virulencia conllevan un riesgo mayor al manipularlas .

## CONCLUSIONES

1.- Las cepas lisas de Br. melitensis (16-M y Rev-1) fueron las más adecuadas para la obtención de polisacárido-B, ya que el rendimiento (en mcg) obtenido a partir de estas fue casi tres veces mayor que el de la cepa rugosa de Br. melitensis (B-115)

2.- La cepa Rev-1 de Br. melitensis resultó ser la más adecuada para la producción de polisacárido-B a utilizar en subsecuentes trabajos de investigación, tomando en cuenta sus necesidades de crecimiento, virulencia y el rendimiento obtenido para la producción del antígeno .

3.- La prueba de IDR utilizando antígeno polisacárido-B permite diferenciar animales infectados de animales vacunados ya sea con la dosis reducida o la dosis completa de la cepa 19 de Br. abortus .

APENDICE : SOLUCIONES Y REACTIVOS

Solución Salina Fisiológica 0.85% (SSF)

Cloruro de sodio ..... 8.5gr

Agua destilada c.b.p. .... 1 lt

Solución de Hidróxido de Sodio (NaOH) 0.1M

Hidróxido de sodio ..... 3.99gr

Agua destilada c.b.p. .... 1 lt

Solución de Hidróxido de Sodio (NaOH) 1M

Hidróxido de sodio ..... 39.9gr

Agua destilada c.b.p. .... 1lt

Solución de Acido Tricloroacético (ATA) 0.5M

Acido Tricloroacético ..... 81.67gr

Agua destilada c.b.p. .... 1 lt

Solución de Fenol al 5%

Fenol ..... 50gr

Agua destilada c.b.p. .... 1 lt

Solución estándar de Glucosa (1mg/ml)

Glucosa anhidra ..... 50mg

Agua destilada c.b.p. .... 50ml

Amortiguador Glicina-NaOH 0.1M pH=8.6

Solución A : Glicina 1M

Glicina ..... 75.07gr

Agua destilada c.b.p. .... 1 lt

Solución B : NaOH 1N

Hidróxido de sodio ..... 40gr



Agua destilada c.b.p. .... 1 lt

Para obtener el pH=8.6 :

Solución A : ..... 100ml

Solución B : ..... 8.0ml

Agua destilada ..... 892ml

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alton, G.G. , Jones, M.L., and Pietz, D.E. . (1975) . Laboratory techniques in brucellosis. World Health Organization. Geneva .Monograph Series No. 55 , 2nd Ed.
- 2.- Alton, G.G. ,Maw, J. , and Rogerson, B.A. . The serological diagnosis of bovine brucellosis: An evaluation of the complement fixation, serum agglutination and Rose Bengal tests. Aust. Vet. J. 51 : 57-63 .
- 3.- Ancha, N.P. y Boris, S. . (1977) . Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales. O.P.S. - O.M.S.
- 4.- Anderson, R.K. , Jenness, R. , Brumfield, H.P. and Gough, P. .(1964) . Brucella agglutinating antibodies : relation of mercaptoethanol stability to - complement fixation. Science 143 : 1334-1335 .
- 5.- Angulo, B y Villa, S.J.J. (1985) . Comparación entre las técnicas de extracción con fenol y ácido tricloroacético para la obtención de antígeno poly-B para el Dx de brucelosis . Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México 1985 . México, D.F. p.p. 47 .
- 6.- Baker, P.J. y Wilson, J.B. (1965). Chemical composition and biological properties of endotoxin of Brucella abortus . J. Bacteriol. 90 : 895-902.
- 7.- Berman, D.T. (1981) . Brucellosis . Ann. Sci. 6 : 271-286.
- 8.- Blood and Henderson. (1977) . Medicina Veterinaria . Ed. Interamericana, S.A. de C.V. , 4a. Edición , México . p.p. 402-704 .
- 9.- Burrows, W. (1981) . Tratado de Microbiología . Ed. Interamericana, S.A. de C.V. , vigésima edición, México . p.p. 472-496 .
- 10.-Buxton, A. and Frasser, G. (1977) . Animal Microbiology . Vol I . Blackwell Scientific Publications , 1st edition . p.p. 123 .

- 11.- Casas Olascoaga, R. (1976) . Diagnóstico de la brucelosis . Zoonosis. O.P.S. - O.M.S. ( 3/4 ) : 107-134 .
- 12.- Carroll, J.A. , Mc. Naught, D.J. , Bourke, A.A. and Alla, G.S. (1978). The diagnostic efficiency of some serological tests for bovine brucellosis. J. Hyg. 80 : 365-371 .
- 13.- Ciprian, C.A. (1978) . Repercusión económica de la brucelosis en México . Memorias del Foro Nacional sobre Brucelosis. INIP - ENEP-C - UNAM. México. p.p. 76-83 .
- 14.- Ciprian, C.A. , Mancera, M.A. , Flores-Castro, R y Ramirez, P. Pruebas de serodiagnóstico en brucelosis. Memorias del III curso de actualización en - Inmunología Veterinaria. INIP . México, D.F. p.p. 119-130 .
- 15.- Comité mixto F.A.O. - O.M.S. de expertos en Brucelosis (1972) . Sto. informe, Ginebra, Suiza.
- 16.- Cortés, A. y Cabello, E. (1970) . Pruebas serodiagnósticas de rutina para el diagnóstico de brucelosis: (Traducido del original : Manual de Reactivos para diagnóstico 65-D ; N.A.D.C., Ames, Iowa. 50010, U.S.A. ). D.G.S.A. - S.A.G..
- 17.- Davis, B. , Dulbecco, R. , Emsen, N.H. , Ginsberg, H.S., Wood, W.B. y Mc. Carty, M. (1978) . Tratado de Microbiología. Salvat Editores, S.A. de C.V. ; Madrid, España . p.p. 1559 .
- 18.- Díaz, R. , Jones, L.M., Leong, D. , and Wilson, J.B. (1968) . Antigenic relationship of the gramnegative organisms causing canine abortion to smooth and rough brucella . J. Bacteriol. 95 : 618-642 .

19.- Díaz, R. , Jones, L.M. , Leong, D. and Wilson, J.B. (1968) .Surface antigens of smooth Brucella. J. Bacteriol. 96(4) : 893-901 .

20.- Díaz, R. y Dorronsoro, I. (1971) . Contribución al diagnóstico serológico de brucelosis y yersiniosis . I : utilidad de la reacción de precipitación en gel. Rev. Clin. Esp. 121 : 367-372

21.- Díaz, R. and Levieux, D. (1972) . Role respectif en serologie de la brucellose bovine des antigens et des immunoglobulins G<sub>1</sub> et G<sub>2</sub> dans les test d'agglutination, de coomb et Rose Bengale ainsi que dans le phenomene de zone. Acad. Sci. 274 : 1593-1596 .

22.- Díaz, R. , Garatea, P., Díaz, L.M., and Moriyón, I. (1979) . Radial immunodiffusion test with a Brucella polysaccharide antigen for differentiating infected from vaccinated cattle. J. Clin. Microbiol. 10 : 37-41 .

23.-Díaz, R. , Toyos, J. , Salvó, M.D. , and Pardo, M.L. (1981) . A simple method for the extraction of polysaccharide-B from Brucella cells for use in the radial immunodiffusion test diagnosis of bovine brucellosis . Ann. Rech. Vet. 12 (1) : 35-39 .

24.- Dubois, M. Giles, K.A. , Hamilton, J.K. , Rebers, P.A. and Smith, F. (1956) . Colorimetric method for determination of sugars and related substances . Ann. Chem . 28 : 350-356 .

25.- Flores Castro, R. (1978) . Características de las brucelas. Memorias del Foro Nacional sobre Brucelosis . INIP - ENEP-C - UNAM, México ,p.p.1-9.

26.- Freeman, B.A. , Mc. Ghee, J.R. , and Baughn, R.E. (1970) . Some physical and taxonomic features of the soluble antigens of the Brucella : J. Infect. Dis. 121 : 522-527 .

27.- Guillespie, H.J. y Timoney, F.J. (1981) . (Hagan y Brunner). Enfermedades infecciosas de los animales domésticos. Edit. La Prensa Médica Mexicana, S.A. , México, p.p. 106-129 .

28.- Hindsdill, R.D. , and Berman, D.T. (1967) . Antigenes of Brucella abortus . I: Chemical and immunoelectrophoretic characterization. J. Bacteriol. 93 : 544-549 .

29.- Iturbe, R. y Goodsaid-Zalduendo, F. (1985) . La virulencia bacteriana y la resolución de una infección : Brucella abortus puede impedir su digestión posterior a la fusión fagosoma-lisosoma . VI. Congreso Nacional de Inmunología. México , 1985 . Resumen No. 086 .

30.- Jawetz, E. , Melnick, J.L. y Adelberg, E.A. (1979) . Manual de Microbiología Médica. Ed. El Manual Moderno, S.A. de C.V. , México , p.p. 6-21 ; 253-256 .

31.- Jones, L.M. and Berman, D.T. (1976) . Studies of Brucella lipopolysaccharide . In. Regamy, R.H. , Hulse, E.C. and Valette, L. (ED) . International Symposium on Brucellosis II . Kappel, Basel 31 : 62-67 .

32.- Jones, L.A. , Berman, D.T. , Moreno, E. , Devoe, B.L. , Gilsdorf, M.J. , Huber, J.D. and Nicoletti, P. (1980) . Evaluation of a radial immunodiffusion test with polysaccharide-B antigen for diagnosis of bovine brucellosis. J. Clin. Microbiol. 12 : 753-760 .

33.- Juárez, P.M. (1982) . Empleo de antígenos solubles de Brucella melitensis y Brucella abortus para diferenciar bovinos infectados de vacunados utilizando la prueba de inmunodifusión doble. (Tesis) F.M.V.Z. - U.N.A.M. , México, p.p. 1-17.

- 34.- Jubb y Kennedy . (1979) . Patología de los animales domésticos. Tomo I . Ed. UPOME , p.p. 105-106 .
- 35.- Lacave, C.J. , Asselineau, A.S. and Roux, J. (1969) . Comparaison chimique d' une fraction lipopolysaccharide et d' une fraction polysaccharide que isolees de Brucella melitensis .Eur. J. Biochem. 9 : 189-198 .
- 36.- Leong, D. , Díaz, R. , Milner, K. , Rudbach, J. and Wilson, J.B. (1970) . Some structural and biological properties of Brucella endotoxin. 'Infect. Immun. 1 : 174-182 .
- 37.- López, M.A. , Hitos, O.F. , Pérez, H.A. y Angulo, G. (1982) . Patología pulmonar en fetos bovinos abortados por Brucella abortus . Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México 1982 . México , p.p. 139-142 .
- 38.- Mancera, M.A. , Ciprian, C.A. , Flores Castro, R y Ramirez, P. (1981) . Pruebas de serodiagnóstico en brucelosis : manual de técnicas de laboratorio. Ed. del Patronato de apoyo a la Investigación y Experimentación Pecuaria en México , A.C. , México, p.p. 119-157 .
- 39.- Memorias del Foro Nacional sobre Brucelosis (1978) . INIP - ENEP-C - UNAM. México. p.p. 109 .
- 40.- Merchant, A.I. , and Packer, R.E. (1975) . Bacteriología y Virología veterinarias . la. reimpression . Ed. Acricbia, España .
- 41.- Meyer, M.E. and Cameron, H.S. (1961) . Metabolic characterization of the genus Brucella. I : Statical evaluation of the oxidative rates by wich type I of each species can be identified. J. Bacteriol. 82 : 387 .
- 42.- Meyer, M.E. and Cameron, H.S. (1961) . Metabolic characterization of the genus Brucella. II: oxidative metabolic patterns of the described species. J. Bacteriol. 82 : 396 .

- 43.-Miles, A.A. (1939) . The antigenic surface of the smooth Brucella-abortus and Brucella melitensis. Brit. J. Exp. Path. 20 : 63-82 .
- 44.- Miller, R.B. (1977) . A summary of the pathogenetic mechanisms involved in bovine abortion. Can Vet. J. 18 (4) : 87-95 .
- 45.- Moreno, E. , Pitt,M.W. , Jones, L.M. , Schuring, G.G. and Berman,D.T. (1979) . Purification and characterization of smooth and rough lipopolysaccharides from Brucella abortus . J. Bacteriol. 138 : 361-369 .
- 46.- Moreno, E. , Berman, D.T. , and Beetcher, L.A. (1981) . Immunochemical characterization of Brucella lipopolysaccharides and polysaccharides. Infect. Immun. 31 (1) : 214-222 .
- 47.- Morilla, G.A. y Bautista, G.C. (1986) . Manual de Inmunología. Ed. Diana , México. p.p. 433 .
- 48.- Morgan, W.J. , Mackinson, D.J. , Gill, K.P.W. , Gower, S.G. and Norris, P.I. (1971) . Standar Laboratory techniques for the diagnosis of - Brucellosis. Ministry of Agricultura, Fisheries and Food ; Central Veterinary Laboratory . Newhaw, Surrey, U.K. p.p. 636-641 .
- 49.-Nicoletti,P.(1978). Diagnóstico de brucelosis : Algunos problemas y nuevos descubrimientos. Memorias del Foro Nacional sobre Brucelosis. INIP-ENEP-C - UNAM. p.p. 67-69 .
- 50.- Ontiveros, C.L. y Tenorio, G.V. (1984) . Avances en la utilización de la prueba de Inmudifusión radial con un antígeno polisacárido-B de Brucella melitensis cepa Rev-1 para el diagnóstico de brucelosis bovina. Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México 1984 . p.p. 177 .
- 51.- Parnas, J. (1961). Differentiation of Brucella by aid of phages. J. Bacteriol. 82 : 319 .

- 52.- Plackett, P., Gottsw, G.S., and Best, S.J. (1976) . An Indirect Haemolysis test (IHILT) for bovine brucellosis. Aust. Vet. J. 52 : 136-140.
- 53.- Ruz, C.M. (1954) . Brucellosis : un problema universal . La Prensa Médica Mexicana , México, p.p. 45-62 .
- 54.- Rodríguez, H.G. (1978) . Epizootiología de la brucellosis . Memorias del Foro Nacional sobre Brucellosis . INIP - ENEP-C - UNAM , p.p. 10-39 .
- 55.- Schurrenberger, R.D. (1981) . An outline of the zoonoses. The Iowa State University Press, Ames, Iowa , U.S.A.
- 56.- Stites, D.P. , Fudenberg, H.H., Cadwell, J.L. and Wells, J.B. (1960) . basic and clinical Immunology . Lange Medical Publications . p.p. 334-374.
- 57.- Sutherland , S.S. (1980) . Immunology of bovine brucellosis. Commonwealth Bureau of Animal Health. The Vet. Bulletin . 50 (5) : 359-368.
- 58.- Vázquez, R.G. (1980) . Estudio epidemiológico de la brucellosis en México durante el período 1972-1976 . (Tesis) , F.M.V.Z. - U.N.A.M.
- 59.- Wayne, W.D. (1979) . Bioestadística : base para el análisis de las ciencias de la salud. Ed. LEMUSA , México. p.p. 485 .
- 60.- Wilson, G.S. and Miles, A.A. (1932) . The serological differentiation of smooth strains of the Brucella group. Brit. J. Exp.. Path. 13 : 1-13.