

Nº 23/
251



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**Facultad de Medicina Veterinaria
y Zootecnia.**

**DIAGNOSTICO DE BRUCELOSIS EN CABRAS, UTILIZANDO
UN EQUIPO DE INMUNOENSAYO ENZIMATICO DISEÑADO
PARA BOVINOS, COMPARANDO LOS RESULTADOS CON
FIJACION DEL COMPLEMENTO.**

T E S I S

**Que para obtener el Titulo de
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
p r e s e n t a
CLAUDIA RAQUEL RODRIGUEZ CUELLAR**



A s e s o r e s :

**MVZ. PhD. Francisco Suárez Güemes
Q. Francisco Velázquez Quezada**

México, D. F.

1992

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

**DIAGNOSTICO DE BRUCELOSIS EN CABRAS, UTILIZANDO UN EQUIPO DE
INMUNOENSAYO ENZIMATICO DISEÑADO PARA BOVINOS,
COMPARANDO LOS RESULTADOS CON FIJACION DEL COMPLEMENTO**

**Tesis presentada ante la
División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
de la
Universidad Nacional Autónoma de México
para la obtención del título de
Médico Veterinario Zootecnista**

Por

Claudia Raquel Rodríguez Cuéllar

Asesores:

MVZ. PhD. Francisco Suárez Gúemes

Q. Francisco Velázquez Quezada

México, D.F.

1992

CONTENIDO

Página

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
MATERIAL Y METODOS.....	8
RESULTADOS.....	14
DISCUSION.....	17
LITERATURA CITADA.....	19
CUADRO.....	24
FIGURAS.....	25

CUADRO Y FIGURAS.

Página

Cuadro 1. Resultados del análisis de los datos para determinar la especificidad, sensibilidad y valor predictivo de ELISA/FC	24
Figura 1.1 Diagrama de la placa para encontrar la dilución óptima de trabajo del antígeno utilizando conjugado a una dilución 1/3200	25
Figura 1.2 Diagrama de la placa para encontrar la dilución óptima de trabajo del antígeno utilizando conjugado a una dilución 1/6400	26
Figura 1.3 Diagrama de la placa para encontrar la dilución óptima de trabajo del antígeno utilizando conjugado a una dilución 1/12800	27
Figura 1.4 Diagrama de la placa para encontrar la dilución óptima de trabajo del antígeno utilizando conjugado a una dilución 1/25600	28

Figura 2. Diagrama de la placa para encontrar la dilución óptima de trabajo del conjugado	29
Figura 3. Esquema de la preparación de las placas en la técnica de ELISA	30

RESUMEN

RODRIGUEZ CUELLAR CLAUDIA RAQUEL. Diagnóstico de brucelosis en cabras, utilizando un equipo de inmunoensayo enzimático (ELISA) diseñado para bovinos, comparando los resultados con fijación del complemento (FC). (Bajo la dirección de: Francisco Suárez Güemes y Francisco Velázquez Quezada).

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa, que afecta principalmente a bovinos, caprinos, ovinos y cerdos. El diagnóstico definitivo se realiza por el aislamiento de *Brucella* de tejidos y exudados orgánicos, pero es lento y complejo. Una alternativa es la serología, las pruebas de aglutinación y de fijación del complemento (FC) son las más empleadas. Recientemente se ha desarrollado la técnica de ELISA, de alta especificidad y sensibilidad. Para determinar la sensibilidad, especificidad y valor predictivo de la prueba de ELISA en relación a FC en cabras, se utilizó el equipo diseñado para bovinos por la Agencia Internacional de la Energía Atómica, empleando el método descrito por Galen *et al.* (15). Fueron analizados 169 sueros de caprinos, 81 provenientes de rebaños brucelosos y 88 provenientes de un rebaño no vacunado, sin que sugieran la presencia de brucelosis. La prueba de ELISA se efectuó según las instrucciones del manual (10), utilizando los reactivos del equipo, y un suero de cabra testigo negativo mexicano. La FC se realizó según la técnica descrita por Alton *et al.* (1) utilizando antígeno de *Brucella abortus* elaborado por la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios. La sensibilidad de ELISA con relación a FC fué de 80 %, ya que 65 de los 81 sueros positivos dieron reacción positiva a ELISA y 16 fueron falsos negativos. La especificidad fué de 100 % ya que los 88 sueros negativos dieron reacción negativa a ELISA. El valor predictivo positivo y negativo fué de 100 % y 84 % respectivamente. La concordancia entre ambas pruebas fué de 90.5 %.

INTRODUCCION

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa de curso crónico que afecta principalmente a bovinos, caprinos, ovinos y cerdos; y que en determinadas circunstancias puede transmitirse al hombre.

La distribución de la enfermedad puede considerarse mundial, y en México se sitúa entre las zoonosis más importantes (13, 25).

Esta enfermedad en los animales, constituye factor de pérdidas económicas muy importante debido a que produce abortos y disminución de la producción láctea (14). El agente etiológico de la enfermedad, *Brucella* spp, fué aislado por primera vez en 1887 por Bruce en la isla de Malta (2, 5, 14, 16, 23, 25). Son 6 las especies de *Brucella* que se reconocen, las cuales tienen diferentes reservorios: *B. melitensis*, las cabras y las ovejas; *B. abortus*, los bovinos; *B. suis*, el cerdo, la liebre y el reno; *B. neotomae*, la rata del desierto; *B. ovis*, la oveja, y *B. canis*, el perro. Las colonias de las 4 primeras especies son lisas, a diferencia de *B. ovis* y *B. canis* que se han observado sólo en forma rugosa. Las especies lisas son consideradas las más patógenas (1, 5, 13, 21, 27).

Brucella spp es un microorganismo cocobacilar, Gram (-), microaerofílico, catalasa y oxidasa (+); hidroliza la urea y reduce los nitratos. Esta bacteria mide 0.5-0.7 x 0.6-1.5 micras, es intracelular facultativa, inmóvil, no esporulada y no posee cápsula bien desarrollada; requiere para su crecimiento medios enriquecidos con sangre o suero y algunas especies o biotipos requieren tensiones aumentadas de CO₂ para su aislamiento primario. Su crecimiento es lento, sus colonias son visibles hasta las 48 h (2, 4, 5, 13, 16, 23, 27).

La principal vía de entrada del microorganismo es la oral, pero existe posibilidad de infección por las vías conjuntival y nasal, por soluciones de continuidad y también por el coito. Las hembras infectadas pueden transmitir la enfermedad in útero a sus crías o mediante la leche en la lactancia. El microorganismo es eliminado por leche, orina y principalmente por secreciones vaginales. La eliminación de brucelas por medio del espermatozoides, sólo ocurre en casos raros (4, 5, 11, 12, 13, 16, 23, 25, 31).

Al entrar al organismo, la bacteria es ingerida por los polimorfonucleares y la capacidad de multiplicación de la Brucella en el interior de las células, les da la oportunidad de invadir el sistema retículo endotelial, así logra llegar a los ganglios linfáticos, invade el sistema linfático y por el ducto torácico llega al torrente sanguíneo. Posteriormente se aloja en diferentes órganos del huésped que generalmente son bazo, hígado, médula ósea, glándula mamaria, útero grávido y tejidos fetales; en machos, órganos genitales (epidídimo y vesículas seminales) y articulaciones (4, 5, 11, 12, 13, 21, 25, 31).

La brucelosis se manifiesta en los animales, produciendo gran cantidad de abortos, dependiendo del número de hembras gestantes y lo avanzado de la gestación, disminución notoria de la fertilidad, retención placentaria, mastitis y en ocasiones existe reabsorción, sin manifestarse ningún signo. Si llega a término la gestación, los animales nacen débiles y muchos mueren. Además en adultos, pueden presentarse signos como, depresión, pérdida de peso, artritis, claudicación y bronquitis, aunque puede existir la infección sin signos aparentes. En machos puede presentarse vesiculitis, orquitis e infertilidad. En general los animales jóvenes son más resistentes que los adultos (8, 13, 14, 16, 21, 23, 25, 26, 31).

Las principales lesiones son, edema uterino y placentitis con edema de las membranas corioalantoideas, ganglios linfáticos aumentados de volumen y edematosos, pueden producirse granulomas en éstos y en órganos genitales de machos; también es común la esplenomegalia y la hepatomegalia (14, 16, 21, 23, 25, 31).

En el humano la enfermedad generalmente es prolongada, de baja mortalidad y muy debilitante (4, 5, 9, 11, 12, 21).

Para la realización del diagnóstico definitivo de la enfermedad, no se consideran suficientes los signos clínicos, siendo sólo orientadores; el diagnóstico anatomopatológico (lesiones en membranas fetales y cotiledones) proporciona datos más valiosos, pero no definitivos. El aislamiento y cultivo del microorganismo a partir de tejidos y exudados orgánicos, aunque es el método más seguro y eficaz, resulta lento y muy complejo para ser aplicado en programas masivos de lucha contra la enfermedad. Una alternativa metodológica empleada es la serología, la cual reduce el tiempo requerido para el diagnóstico de la brucelosis. Entre los métodos empleados más comúnmente se encuentran las pruebas de aglutinación y la prueba de FC. Las pruebas de aglutinación, que se utilizan con mayor frecuencia, tienen la desventaja de producir reacciones falsas negativas y falsas positivas. La FC es una de las pruebas más recomendables para el diagnóstico de ésta enfermedad, principalmente en bovinos, ovinos y caprinos, donde es utilizada ampliamente como prueba complementaria en muestras que presentan un título sospechoso en la prueba de aglutinación. Diversas investigaciones han demostrado la alta especificidad y la alta correlación entre infección y títulos positivos en esta prueba, debido a la ventaja de que identifica preferentemente inmunoglobulinas de la clase IgG1 y no anticuerpos aglutinantes asociados con la vacunación, por lo tanto es considerada como una técnica altamente específica y más sensible que la de aglutinación (1, 11, 27, 28).

En los últimos años, se ha iniciado el uso de los inmunoensayos, los que se están utilizando ampliamente debido a su alta especificidad y sensibilidad para detectar concentraciones bajas de anticuerpos (inmunoglobulinas de las clases IgG1, IgG2 e IgM) o antígenos bacterianos. Siendo todo esto equiparable con lo que presenta la prueba de FC y agregando la facilidad de manejo de la prueba de ELISA, esta podría llegar a ser en el futuro la técnica de elección para el

diagnóstico de la brucelosis, además de que no requiere de equipo sofisticado y pueden ser analizadas varios sueros simultáneamente (3, 4, 7, 8, 16, 18, 19, 20, 23, 24, 27, 29, 30).

Dentro de las medidas preventivas que se utilizan para el control de la brucelosis existen diferentes productos biológicos que se utilizan para la inmunización del ganado; en cabras a partir de *B. melitensis* tenemos a la bacterina H38 con adyuvante y la vacuna Rev 1, siendo ésta última la más utilizada. La vacuna Rev 1 se prepara a partir de una cepa lisa atenuada de *B. melitensis*, aislada de células estreptomycinina dependientes, la cual es estable, de baja virulencia, altamente antigénica y no revierte a patógena por pasajes continuos, puede usarse a la dosis $1-2 \times 10^4$ UFC/ml en caprinos de 3-8 meses de edad, pero no debe utilizarse en hembras adultas, puesto que quedarían como positivas a pruebas serodiagnósticas, ni en cabras preñadas o lactando, porque produciría abortos y se eliminaría por leche. Por lo tanto en adultos sólo puede ser aplicada la vacuna Rev 1 pero a dosis reducida 5×10^4 UFC/ml y aún en gestantes y lactantes, sin producir los efectos descritos anteriormente, además las cabras vacunadas quedarían negativas a pruebas serológicas de 3-7 meses posteriores a la vacunación (6, 11, 12, 13, 21, 22, 25, 30).

HIPOTESIS

La prueba de ELISA diseñada para bovinos muestra igual sensibilidad y especificidad que la prueba de fijación de complemento, para detectar anticuerpos contra *B. melitensis* en caprinos.

OBJETIVOS

Determinar la sensibilidad, especificidad y valor predictivo de la prueba de ELISA en relación a la prueba de FC en cabras, utilizando el equipo diseñado para bovinos por la Agencia Internacional de la Energía Atómica.

MATERIAL Y METODOS

Sueros a analizar

Se analizaron 160 sueros de caprinos de los cuales 81 fueron provenientes de varios rebaños de caprinos en Chihuahua, donde se han informado casos clínicamente positivos a brucelosis; y 88 provinieron de un rebaño de caprinos no vacunados, localizado en el Centro Experimental La Unión del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias SARH, en Cerro de Piedra Gro., donde nunca se han registrado problemas que sugieran la presencia de brucelosis. Dichos sueros fueron conservados a -20 C en viales independientes hasta el momento de su utilización. La dilución de trabajo para la prueba de ELISA fué de 1/200 como se indica en el manual de ELISA (10).

PRUEBA DE ELISA

SUERO TESTIGO NEGATIVO

Se recolectaron 2 sueros de un rebaño de caprinos en la zona de Apasco Edo. de México, en donde se han mantenido los animales libres de brucelosis mismos que se utilizaron para establecer la especificidad de la prueba, conservándose a -20 C hasta su utilización. La dilución de trabajo fué de 1/200.

SUERO TESTIGO POSITIVO

Para la titulación de los reactivos utilizados en la prueba (conjugado y antígeno), se usó el suero positivo del equipo de ELISA, donado por la FAO y la Agencia Internacional de la Energía Atómica, el cual contiene un alto nivel de anticuerpos contra Brucella abortus; mismo que fué reconstituido en 1 ml de agua destilada y subdividido en alícuotas de 0.1 ml, almacenándose a -20 C hasta su utilización. La dilución de trabajo fué de 1/200.

ANTIGENO

Se utilizó el antígeno del equipo de ELISA, el cual es un extracto de lipopolisacárido liso inactivado por calor y liofilizado, que fué reconstituido en 1 ml de agua destilada, subdividido en alícuotas de 200 μ l y conservado a -20 C hasta su utilización. Su dilución óptima a utilizar se estableció durante la estandarización de la prueba.

CONJUGADO

Se empleó el conjugado del equipo de ELISA, que está formado por una antiIgG de conejo liofilizada, y marcado con peroxidasa, el cual fué reconstituido en 1 ml de agua destilada, diluido en 9 ml de solución amortiguada (PBS) y guardado en alícuotas de 0.2 ml, conservándose a -20 C hasta su utilización. Su dilución óptima a utilizar se estableció durante la estandarización de la prueba.

SUSTRATO

Se utilizó la solución del equipo de ELISA, formada por: solución amortiguada para sustrato, cromógeno y sustrato; la cual fué preparada inmediatamente antes de su uso, agregando 250 μ l de solución de ácido 2, 2 dietil bentiazolina del ácido sulfónico (ABTS) y 50 μ l de peróxido de hidrógeno, por cada 10 ml de solución amortiguada para sustrato.

FIJACION DEL COMPLEMENTO**ANTIGENO**

Fué utilizado el antígeno para FC de Brucella abortus de la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios, cepa 1119-3 concentrada e inactivada por calor, conservándose a 4 C hasta su uso. La dilución empleada fué de 1/200.

HEMOLISINA

Se dispuso suero hiperinmune de conejo anti-glóbulos rojos de camero, diluido a partes iguales con glicerol que fué conservado a 4 C hasta su utilización. Su dilución óptima de trabajo se estableció durante la estandarización de la prueba.

COMPLEMENTO

Se empleó suero de cuye el cual se tituló bajo la técnica descrita por Alton *et al.* (1) y fué distribuido en alícuotas de 0.25 y de 0.5 ml conservándose a -20 C hasta su uso. Para la prueba fueron utilizadas 2 unidades fijadoras del complemento. Su dilución óptima de trabajo se estableció durante la estandarización de la prueba.

GLOBULOS ROJOS DE CARNERO

Se obtuvo sangre de camero, que fué llevada a tubos con solución de Alsever a partes iguales y mantenida a 4 C. Después de 5 días y hasta 60 días, se utilizaron los glóbulos rojos previo lavado con solución amortiguada con veronal por centrifugación y ajustados a una concentración de 2 % en solución amortiguada con veronal (SAV).

ESTANDARIZACION DE LA PRUEBA DE ELISA

ANTIGENO

El antígeno del equipo de ELISA fué titulado realizando dos diluciones 1/4000 y 1/8000 en solución amortiguada de revestimiento, con las cuales se sensibilizaron 2 placas para prueba de ELISA cada una con una dilución respectivamente, agregando 100 μ l por pozo, se incubó a 37 C durante 2 horas.

Al término de la incubación se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con solución fosfatada adicionada con 0.05% de Tween 20 (PBS T 20) y se hicieron diluciones 1/200 de los sueros utilizados (testigos positivo y negativo, suero de caprino negativo, suero bovino negativo, suero caprino vacunado y suero positivo caprino) con solución amortiguada diluyente, dilución recomendada en el manual del equipo de ELISA (10); los sueros fueron agregados a la placa en triplicado de la manera que se ilustra en la fig. 1 e incubados 1 hora a 37C.

Se efectuaron 3 lavados de 5 min cada uno con PBS T 20. Posteriormente se agregó el conjugado, realizando las siguientes diluciones dobles 1/3,200, 1/6,400, 1/12,800 y 1/25,600 en solución amortiguada de ELISA con pH de 7.4, adicionada con 0.1% de Tween 20 (100 μ l por pozo), como se ilustra en la fig. 1. Se incubaron las placas 1 hora a 37 C. Se lavaron nuevamente 3 veces por 5 minutos cada vez con PBS T 20. Se adicionaron 100 μ l por pozo de sustrato a ambas placas y se incubaron a temperatura ambiente protegidas de la luz por 10 min. La reacción fué detenida adicionando 100 μ l de azida de sodio por pozo (dilución 1/1000 en agua destilada).

La absorbancia fué medida en un lector de ELISA, utilizando un filtro de 405 nm de longitud de onda.

CONJUGADO

La titulación del conjugado se efectuó revistiendo una placa para prueba de ELISA con el antígeno del equipo de ELISA, diluido 1/8000 en solución amortiguada diluyente, que fué la dilución óptima del antígeno. Se agregaron 100 μ l por pozo. Se incubó durante 2 horas a 37 C. Posteriormente a la incubación, se realizaron 3 lavados cada uno de 5 min con PBS T 20. Se hicieron diluciones 1/200 de los sueros testigo positivo y negativo, y se utilizaron además un suero negativo caprino, uno positivo bovino (*B. abortus*), uno positivo canino (*B. canis*) y otro negativo canino, los cuales fueron distribuidos en duplicado en la placa (fig. 2), e incubados una hora a 37 C. Al término de la incubación se realizaron los lavados de costumbre (3 de 5 min cada uno con PBS T 20) y después dos diluciones del conjugado 1/3,200 y 1/6,400 en solución amortiguada de ELISA adicionada con 0.1% de T 20, las diluciones fueron colocadas en la placa como se ilustra en la fig. 2. Se incubó 1 hora a 37 C. La placa fué lavada 3 veces con intervalos de 5 min con PBS T 20. En seguida se adicionaron 100 μ l por pozo de sustrato a la placa completa y se incubó a temperatura ambiente protegida de la luz por 10 min. La reacción fué detenida adicionando 100 μ l por pozo de azida de sodio.

La absorbancia fué medida en un lector de ELISA utilizando un filtro de 405 nm de longitud de onda.

ESTANDARIZACION DE LA PRUEBA DE FIJACION DEL COMPLEMENTO

HEMOLISINA

Se preparó una dilución madre 1/100 de hemolisina, a partir de la cual se prepararon las diluciones 1/1000, 1/1500, 1/2000, 1/3000, 1/5000, 1/8000 y 1/16000 con diluyente de fijación de complemento.

Se añadió 1 ml de la dilución de hemolisina a 1 ml de hematíes de camero al 2 %, se mezcló y se dejó a temperatura ambiente por 15 min para sensibilizarlos. A una serie de 7 tubos, se añadió 1.0 ml de diluyente y 0.5 ml de complemento diluido para obtener así una hemólisis de 70 a 80 % con las diluciones de hemolisina más concentradas. Se agregaron 0.5 ml de una de las 7 suspensiones de hematíes sensibilizados a cada tubo que contenía complemento y diluyente, y se mezcló bien. Se mantuvieron los tubos en baño maría a 37 C por media hora, agitándose a los 15 min. Posteriormente se añadieron 2 ml de diluyente frío a cada uno y se centrifugaron para depositar los hematíes que quedaban sin lisar. En el sobrenadante de cada tubo, se midieron las densidades ópticas (D.O.) en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm. Se calculó el porcentaje de hemólisis y se graficaron los valores contra la dilución de hemolisina.

COMPLEMENTO

Se sensibilizaron glóbulos rojos mezclando volúmenes iguales de hemolisina titulada al 20 % y eritrocitos al 2 %; se mezclaron y dejaron en reposo 15 min a temperatura ambiente. Se preparó una dilución madre de complemento (1/35) y una dilución para la titulación del complemento (1/350). Se utilizaron 6 tubos a los cuales se les agregó primero el complemento diluido 1/350 (tubo 1, 0.3 ml; tubo 2, 0.4 ml; tubo 3, 0.5 ml; tubo 4, 0.6 ml; tubo 5, 0.7 ml; tubo 6,

0.8 ml), posteriormente el diluyente, en cantidad para completar un volumen de 1.5 ml (tubo 1, 1.2 ml; tubo 2, 1.1 ml; tubo 3, 1 ml; tubo 4, 0.9 ml; tubo 5, 0.8 ml; tubo 6, 0.7 ml), y por último los glóbulos rojos sensibilizados (0.5 ml a cada tubo). Se mezclaron e incubaron en baño maría a 37 C por 30 min, agitándose a los 15 min. Al término de la incubación se agregaron 2 ml de diluyente frío a cada tubo y se centrifugaron. A continuación se vertieron los sobrenadantes de cada tubo y se determinaron las D.O. respectivas en el espectrofotómetro. El porcentaje de hemólisis se calculó igual que en la titulación de la hemolisina. Se calcularon los valores de la expresión $y/(100-y)$ para cada cantidad de complemento ($y = \% \text{ de hemólisis}$; $100 - y = \text{glóbulos rojos no hemolizados}$).

TECNICA DE ELISA

Al haber obtenido la dilución óptima del antígeno, la cual fué 1/8000, se procedió a sensibilizar las placas a utilizarse.

La dilución fué realizada en solución amortiguada de revestimiento; las placas revestidas fueron incubadas a 37 C durante 2 horas, quedando así el antígeno fijo en ellas.

Los pozos A1 y B1 fueron aquéllos con los cuales se ajustó la lectura de cada placa a cero ("pozos blancos"), los pozos 1C, 7C, 1Fy 7F fueron los controles para detectar la unión inespecífica del conjugado, los pozos 1D y 7D fueron los controles positivos y los pozos 1E y 7E los controles negativos. (Fig 3)

Después de la incubación se procedió a realizar las diluciones de los sueros que se examinarían, primero utilizando una dilución 1/40 en tubo con solución amortiguada diluyente y posteriormente ya en la placa una dilución 1/200. Cada suero se probó por duplicado. Se incubaron las placas 1 hora a 37 C, agitándose cada 20 min. Después se lavaban 3 veces, 5 min con PBS T 20.

Al término del lavado se agregaba a toda la placa (excepto pozos A1 y B1) el conjugado diluido 1/3200 en solución amortiguada diluyente (50 µl/pozo) y se incubaba 1 hora a 37 C.

Posteriormente se aplicaba el sustrato a toda la placa (100 µl/pozo); incubándose a temperatura ambiente, protegidas de la luz y la reacción enzimática se detenía con azida de sodio a los 10 min.

La absorbancia fué medida con el lector de ELISA, utilizando un filtro de 405 nm de longitud de onda.

Se calculó el valor de adherencia para determinar la sensibilidad analítica en cada placa, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Valor de adherencia} = \frac{\text{promedio de la D.O. de la referencia positiva}}{\text{promedio de la D.O. de la referencia negativa}}$$

Se calcularon los valores negativos/ positivos aislados para cada placa (valor de corte), doblando el promedio de los valores de D.O. de la referencia negativa de los sueros en esa placa. Los sueros que daban valores de D.O. mayores a estos valores fueron considerados positivos.

TECNICA DE FIJACION DEL COMPLEMENTO

Los sueros a analizar fueron diluidos 1/4 cada uno con SAV e inactivados a 58-60 C durante 30 min. Posteriormente se adicionaron 25 µl de SAV en cada pozo de las microplacas con fondo de "u", excepto el primer pozo de cada fila, enseguida se agregaron 25 µl de la dilución del suero inactivado de la primera muestra a analizar en los pozos primero, segundo y último de la primera fila. De igual manera se realizó en las demás filas con todos los sueros. Se procedió a la dilución seriada simultanea en todas las filas, empezando por el segundo pozo y terminando con el penúltimo, del cual se extraían y desechaban 25 µl.

Una vez diluidos todos los sueros, se agregaron 25 μ l de antígeno diluido en cada pozo, excepto el último de cada fila (que sirvió como testigo para la actividad anticomplementaria del suero), más 25 μ l de complemento en todos los pozos. Las microplacas fueron incubadas a 37 C en baño maría durante 30 min. A los 15 min de la incubación, se preparó la mezcla hemolítica. Al término de la incubación se agregaron 25 μ l de glóbulos rojos sensibilizados en cada pozo y se incubaron a 37 C en baño maría por 30 min. A los 15 min de la incubación se agitaron las placas para evitar sedimentación y se continuó la incubación. Por último se procedió a centrifugar todas las placas y se realizó la lectura visualmente por un técnico especializado, tomando como punto final de la reacción la última dilución que presentó una fijación apreciable (botón de glóbulos rojos y líquido claro e incoloro); ésta dilución se consideró el título de cada suero. Los resultados fueron comparados conforme a los sueros testigo positivo y negativo.

ANALISIS DE LO DATOS

Se utilizó el método descrito por Galen *et al.* (15), para determinar la especificidad, sensibilidad, valor predictivo positivo y negativo de la prueba de ELISA, y la concordancia entre las pruebas utilizadas.

RESULTADOS

ESTANDARIZACION DE LA PRUEBA DE ELISA

La dilución óptima del antígeno del equipo de ELISA, se localizó en la placa en la cual la absorbancia tuvo un valor elevado (1.177) para los sueros positivos y uno bajo (0.122) para los sueros negativos, encontrándose la mayor diferencia en la placa en la cual se utilizó la dilución 1/8000.

La dilución óptima del conjugado del equipo de ELISA, fué determinada comparando los valores de absorbancia de los sueros control positivo y negativo, de los sueros de caprino, de bovino y de canino, con relación a las 2 diluciones del conjugado; se observó que los mejores valores se encontraban a la dilución 1/3,200, donde el valor de D.O. fué lo suficientemente elevado (0.875) para obtener una adecuada reacción en la prueba, sin que existieran problemas de saturación de la placa por un exceso de conjugado que produjeran valores de absorbancia demasiado altos y no medibles por el lector, ni tampoco valores muy bajos (0.105) debido a una insuficiente cantidad de conjugado en la reacción.

INTERPRETACION DE LA PRUEBA DE ELISA

Se calcularon los promedios de las referencias negativa, positiva y de los sueros problema en duplicado para cada placa.

El valor de adherencia en cada una de las placas fué mayor a 6.

El valor de corte de la primera placa fué 0.088, el de la segunda fué 0.114, el de la tercera 0.114 y el de la última 0.076.

De las 88 muestras obtenidas a partir del rebaño de caprinos no vacunados, donde nunca se han reportado problemas que sugieran la presencia de brucelosis, 88 resultaron negativas (100 %); y de las 81 muestras provenientes de rebaños de caprinos donde se informaron casos clínicamente positivos a brucelosis y que reaccionaron positivas a la prueba de FC, 65 resultaron positivas (80 %) a la prueba de ELISA.

ESTANDARIZACION DE LA PRUEBA DE FIJACION DEL COMPLEMENTO

La dilución óptima encontrada para la hemolisina fué de 1/3000.

La dilución óptima del complemento, donde se localizaron las 2 unidades fijadoras del complemento fué 1/30.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS DE LA PRUEBA DE FIJACION DEL COMPLEMENTO

Se consideraron como positivos aquellos sueros que presentaron una dilución mayor a 1/8. De los 88 muestras obtenidas a partir del rebaño de caprinos no vacunados donde nunca se han reportado problemas que sugieran la presencia de brucelosis, 88 resultaron negativos (100 %). De las 81 muestras provenientes de rebaños de caprinos donde se reportaron casos clínicamente positivos a brucelosis, las 81 muestras (100 %), resultaron positivas en esta prueba.

ANALISIS DE LOS DATOS

Los resultados del análisis de los datos al utilizar el método de Galen *et al.* para determinar la especificidad y sensibilidad, se muestran en el cuadro No. 1.

ELISA/FC

Sensibilidad = $65/81 \times 100 = 80.2 \%$

Especificidad = $88/88 \times 100 = 100 \%$

Valor predictivo positivo = $65/65 \times 100 = 100 \%$ (confiabilidad de la prueba)

Valor predictivo negativo = $88/104 \times 100 = 84 \%$

Concordancia = $(65 + 88) / 169 \times 100 = 90.5 \%$

Como podemos observar, la sensibilidad de la prueba de ELISA utilizada en este trabajo, con relación a la prueba de FC fué de 80 %, ya que 65 de los 81 sueros provenientes de animales positivos a FC dieron reacción positiva a la prueba de ELISA y 16 fueron falsos negativos. Con relación a la especificidad, ésta fué del 100 % ya que el total de 88 sueros negativos a FC dieron reacción negativa a la prueba de ELISA.

Al no existir ningún suero considerado como falso positivo, el cálculo del valor predictivo positivo de la prueba fué del 100 % de confiabilidad, sin embargo la existencia de 16 falsos negativos nos dió un valor predictivo negativo de 84 %.

Finalmente, la concordancia entre ambas pruebas resultó ser de 90.5 %.

DISCUSION

Al correlacionar la prueba de ELISA con FC se observó que la especificidad determinada para ELISA en caprinos, fué de 100 % y la sensibilidad de 80 %, a diferencia de lo reportado en un estudio realizado por Sutherland (29) en donde ELISA resultó con una sensibilidad de 96 % y especificidad del 81 %, la diferencia con los resultados obtenidos en el presente trabajo, puede deberse a que Sutherland (29) utiliza el aislamiento bacteriano para determinar sensibilidad y especificidad, y nosotros utilizamos como prueba de referencia a FC.

En otros estudios Hobbs (18) al igual que Dohoo (7), reportan que tanto FC como ELISA tienen una especificidad muy similar para detectar animales vacunados y no vacunados con B. abortus.

Por su parte Heck (17) demuestra que ELISA es considerablemente más sensible que los métodos convencionales, entre ellos la prueba de FC.

Una explicación en cuanto a las diferencias obtenidas entre este trabajo y lo reportado por Hobbs (18), Dohoo (7) y Heck (17), es que ellos trabajaron con sueros de bovinos utilizando un antígeno de B. abortus y nosotros utilizamos sueros de cabras utilizando un antígeno de B. abortus.

Lo anterior, como ya se mencionó, con la finalidad de utilizar el equipo de ELISA diseñado para el diagnóstico de brucelosis en bovinos.

Al respecto, cabe mencionar los estudios de Escalante (8) y Galen (15), quienes afirman que al aumentar la sensibilidad en una prueba serológica disminuye su especificidad, y los criterios para optar por mayor o menor sensibilidad, dependerán de la seroprevalencia presente en la población y del objetivo que se busque.

En condiciones normales, cuando existe alta prevalencia, la prueba tiende a comportarse mejor para detectar mayor número de positivos, a diferencia de donde existe baja prevalencia con las mismas características se obtiene un mayor número de falsos positivos, en consecuencia la confiabilidad del diagnóstico positivo disminuye.

En el presente trabajo observamos que la prueba de ELISA es un método diagnóstico eficaz y más específico que FC para detectar brucelosis en cabras. Sin embargo, los resultados obtenidos fueron establecidos en condiciones experimentales donde los sueros positivos y negativos se utilizaron en un número similar y simulando situaciones de alta prevalencia, por lo cual sería recomendable realizar posteriores trabajos pero bajo condiciones de campo, tanto en zonas donde exista alta prevalencia, como en otras donde haya baja prevalencia, para así determinar su comportamiento.

LITERATURA CITADA

- 1.-Allon, G.G., Jones, L.M. y Pietz, D.E.: Las Técnicas de Laboratorio en la Brucelosis. 2a ed. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, 1976.
- 2.-Burdon, K.L.: Textbook of Microbiology. 4a ed. The MacMillan Company, New York, 1958.
- 3.-Byrd, J.M., Heck, F.C. and Hidalgo, R.J.: Evaluation of the enzyme linked immunosorbent assay for detecting Brucella abortus antibodies. Am. J. Vet. Res., 40: 896-898 (1979).
- 4.-Carpenter, P.L.: Microbiología. 4a ed. Interamericana, México D.F., 1982.
- 5.-Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N., Ginsberg, H.S. and Wood, W.B.: Microbiology. 2nd ed. Harper and Row Publishers, Hagerstown, Maryland, 1973.
- 6.-Díaz, A.E.: Inmunidad conferida por la vacunación y revacunación con REV 1 en dosis reducida en cabras adultas y evaluación de pruebas serodiagnósticas. Tesis de maestría. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 1989.
- 7.-Dohoo, I.R., Wright, P.F., Ruckerbauer, G.M., Samagh, B.S., Robertson, F.J. and Forbes, L.B.: A comparison of five serological tests for bovine brucellosis. Can. J. Vet. Res., 50: 485-493 (1986).

8.-Escalante, O.C.: Determinación de anticuerpos contra Chlamydia psittaci en ovinos del COPEA mediante una prueba indirecta de ELISA. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zool. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 1988.

9.-Escárzaga, E.: Brucelosis: Algunos aspectos de la infección en humanos. Memorias del Foro Nacional de Brucelosis. 47-59. SARH-UNAM, México D.F. (1978).

10.-FAO-IAEA. ELISA kit for the detection of antibodies against Brucella abortus. Division International Atomic Energy Agency. Vienna, Austria (1989).

11.-FAO-OMS. Comité Mixto de Expertos en Brucelosis. Quinto informe. Serie de Informes técnicos No. 464. OMS, Ginebra, Suiza (1970).

12.-FAO-OMS. Comité Mixto de Expertos en Brucelosis. Sexto informe. Serie de informes técnicos No. 740. OMS, Ginebra, Suiza (1986).

13.-Flores, C.R.: Características de las brucelas. Memorias del Foro Nacional de Brucelosis. 1-9. SARH-UNAM, México D.F., 1978.

14.-Flores, C.R.: Brucelosis. En: Principales Enfermedades de los Ovinos y Caprinos. Editado por Tórtora, J. y Pijoan, P., 173-177, FESC UNAM, México, 1986.

15.-Galen, R.S. and Gambino, S.R.: Beyond Normality: The Predictive Value and Efficiency of Medical Diagnoses. John Wiley and Sons, New York, 1975.

16.-Gillespie, J.H y Timoney, J.F.: Enfermedades Infecciosas de los Animales Domésticos. 4a ed. La Prensa Médica Mexicana, México, 1983.

17.-Heck, F.C., Deyoe, B.L. and Williams, J.D.: Antibodies to Brucella abortus in sera from strain 19 vaccinated and non-vaccinated cows as determined by enzyme linked immunosorbent assay and conventional serological methods. Vet. Immunol and Immunopatol., 3: 629-634 (1982).

18.-Hobbs, I.F.: Comparison of the indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) with the complement fixation test (CFT) for the serodiagnosis of bovine brucellosis. N. Z. Vet. J., 33: 112-118 (1985).

19.-Larsen, J.W.A., Webber, J.J. and Edwards, L.D.: A field outbreak of bovine brucellosis-comparisons of CFT, ELISA and culture results. Aust. Vet. J., 65: 30-31 (1988).

20.-Limet, J.N., Kerkitofs, P., Wijffels, R. and Dekeyser, P.: Serological diagnosis of bovine brucellosis by ELISA. Vet. Bull., 3: 181 (1989).

21.-Mancera, M.A.: Respuesta serológica de cabras Jóvenes inoculadas con diferentes dosis de la cepa REV 1 de Brucella melitensis. Comparación de pruebas y hallazgos al desafío controlado. Tesis de maestría. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., 1990.

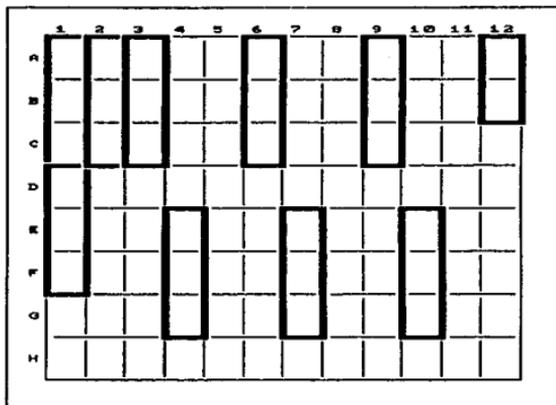
- 22.-Mancera, M.A., Díaz, A.E., Vázquez, N.J., Velázquez, Q.F., Suárez, G.F. y Flores, C.R.: Vacunación de cabras con la cepa REV-1 de *Brucella melitensis* en diferentes dosis: Evaluación serológica y desafío. Vel. Méx., 2: 117-123 (1992).
- 23.-Merchant, I.A. y Packer, R.A.: Bacteriología y Virología Veterinaria. 3a ed. Acribia. Zaragoza, 1970.
- 24.-Mora, I.M.O: Prevalencia de linfadenitis caseosa en ovinos del COPEA determinada mediante una prueba indirecta de ELISA. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., 1990.
- 25.-Rodríguez, H.G.A.: Epizootiología de la brucelosis. Memorias del Foro Nacional de Brucelosis. 10-39 SARH-UNAM., México D.F. (1978).
- 26.-Suarez, G.F. y Flores, C.R.: Brucelosis en diferentes especies animales. Memorias del Foro Nacional de Brucelosis. 40-46. SARH-UNAM., México D.F., 1978.
- 27.-Suarez, G.F.: Diagnóstico bacteriológico y serológico de *Brucella*. III Curso Internacional de Reproducción Bovina. 155-161. UNAM/FMVZ/AIBIR., México (1991).
- 28.-Sutherland, S.S.: Immunology of bovine brucellosis. Vel. Bull., 50: 359-368 (1980).
- 29.-Sutherland, S.S.: Evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay in the detection of cattle infected with *Brucella abortus*. Vel. Microbiol., 10: 23-32 (1984).

30.-Sutherland, S.S.: Comparison of enzyme linked immunosorbent assay and complement fixation test for the detection of specific antibody in cattle vaccinated and challenged with Brucella abortus. J. Clin. Microbiol., 22: 44-47 (1985).

31.-Thoen, C.O. and Enright F.: Brucella. In: Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. Edited by Gyles, C.L., Thoen, C.O. and 22 contributors, 160-171, Iowa State University Press/Ames, Iowa, 1986.

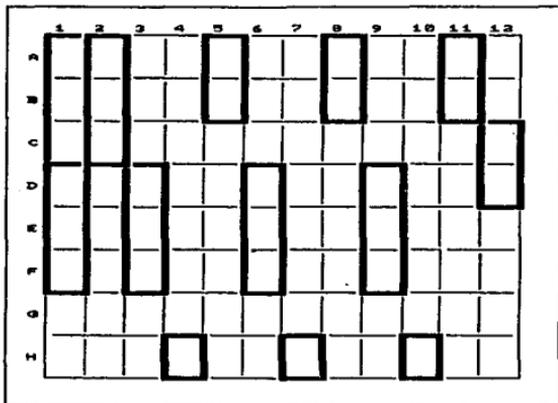
		F. C.		
		+	-	
ELISA	+	a 65	b 0	a + b 65
	-	c 16	d 88	c + d 104
		a + c 81	b + d 88	N 169

CUADRO 1. RESULTADOS DEL ANALISIS DE LOS DATOS
PARA DETERMINAR LA ESPECIFICIDAD,
SENSIBILIDAD Y VALOR PREDICTIVO DE
ELISA/FC.



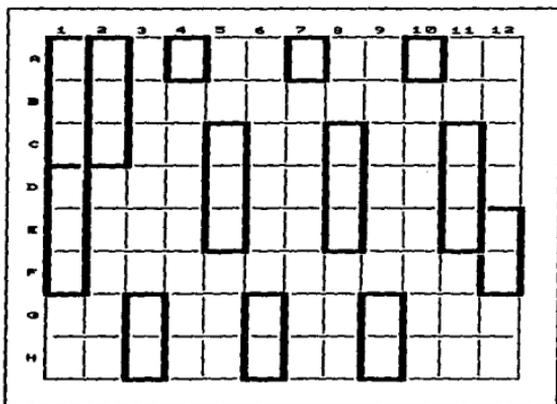
A1, B1, C1 SOLO SUBSTRATO
D1, E1, F1 SUBSTRATO Y CONJUGADO
A2, B2, C2 SUERO POSITIVO ELISA, SUBSTRATO Y CONJUGADO
A3, B3, C3 SUERO POSITIVO ELISA
E4, F4, G4 SUERO NEGATIVO ELISA
A6, B6, C6 SUERO POSITIVO BOVINO
E7, F7, G7 SUERO VACUNADO
A9, B9, C9 SUERO NEGATIVO BOVINO
E10, F10, G10 SUERO NEGATIVO CABRA
A12, B12 ANTIGENO, SUBSTRATO Y CONJUGADO

FIG. 1.1 DIAGRAMA DE LA PLACA PARA ENCONTRAR LA DILUCION OPTIMA DE TRABAJO DEL ANTIGENO UTILIZANDO CONJUGADO A UNA DILUCION 1/3200.



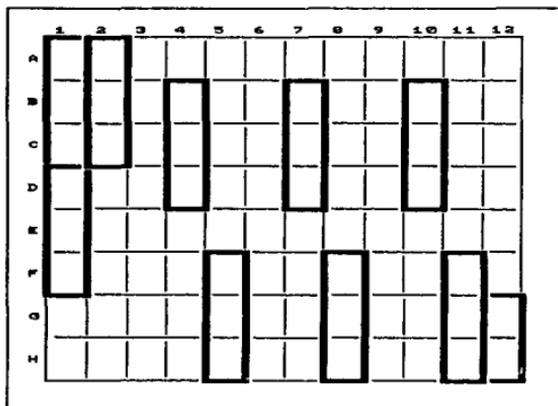
A1, B1, C1 SOLO SUBSTRATO
 D1, E1, F1 SUBSTRATO Y CONJUGADO (1/3200)
 A2, B2, C2 SUERO POSITIVO ELISA, SUBSTRATO Y CONJUGADO (1/3200)
 D3, E3, F3 SUERO POSITIVO ELISA
 H4, A5, B5 SUERO NEGATIVO ELISA
 D6, E6, F6 SUERO POSITIVO BOVINO
 H7, A8, B8 SUERO VACUNADO
 D9, E9, F9 SUERO NEGATIVO BOVINO
 H10, A11, B11 SUERO NEGATIVO CABRA
 C12, D12 ANTIGENO, SUBSTRATO Y CONJUGADO (1/3200)

FIG. 1.2 DIAGRAMA DE LA PLACA PARA ENCONTRAR LA DILUCION OPTIMA DE TRABAJO DEL ANTIGENO UTILIZANDO CONJUGADO A UNA DILUCION 1/6400.



A1, B1, C1 SOLO SUSTRATO
 D1, E1, F1 SUSTRATO Y CONJUGADO ($1/3200$)
 A2, B2, C2 SUERO POSITIVO ELISA, SUSTRATO Y CONJUGADO ($1/3200$)
 D2, E2, F2 SUERO POSITIVO ELISA
 G2, H2, A3 SUERO NEGATIVO ELISA
 D3, E3, F3 SUERO POSITIVO BOVINO
 G3, H3, A4 SUERO NEGATIVO BOVINO
 D4, E4, F4 SUERO UACUNADO
 G4, H4, A5 SUERO NEGATIVO BOVINO
 D5, E5, F5 SUERO NEGATIVO CABRA
 G5, H5, A6 ANTIGENO, SUSTRATO Y CONJUGADO ($1/3200$)
 D6, E6, F6

FIG. 1.3 DIAGRAMA DE LA PLACA PARA ENCONTRAR LA DILUCION OPTIMA DE TRABAJO DEL ANTIGENO UTILIZANDO CONJUGADO A UNA DILUCION $1/12800$.



A1, B1, C1 SOLO SUSTRATO
 D1, E1, F1 SUSTRATO Y CONJUGADO (1/3200)
 A2, B2, C2 SUERO POSITIVO ELISA, SUSTRATO Y CONJUGADO (1/3200)
 B4, C4, D4 SUERO POSITIVO ELISA
 F5, G5, H5 SUERO NEGATIVO ELISA
 B7, C7, D7 SUERO POSITIVO BOVINO
 F8, G8, H8 SUERO VACUNADO
 B10, C10, D10 SUERO NEGATIVO BOVINO
 F11, G11, H11 SUERO NEGATIVO CABRA
 G12, H12 ANTIGENO, SUSTRATO Y CONJUGADO (1/3200)

FIG. 1.4 DIAGRAMA DE LA PLACA PARA ENCONTRAR LA DILUCION OPTIMA DE TRABAJO DEL ANTIGENO UTILIZANDO CONJUGADO A UNA DILUCION 1/25600.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

29

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		+	++					+	++			
B												
C		+	++					+	++			
D												
E		+	++					+	++			
F												
G								+	++			
H												

A2, A3, B2, B3 SUERO POSITIVO ELISA
 C2, C3, D2, D3 SUERO NEGATIVO ELISA
 E2, E3, F2, F3 SUERO NEGATIVO DE CABRA
 A8, A9, B8, B9 SUERO POSITIVO DE PERRO
 C8, C9, D8, D9 SUERO NEGATIVO DE PERRO
 E8, E9, F8, F9 SUERO POSITIVO DE BOVINO
 G8, G9, H8, H9 SUERO NEGATIVO DE BOVINO
 + DILUCION 1/3200 DEL CONJUGADO
 ++ DILUCION 1/6400 DEL CONJUGADO

FIG. 2 DIAGRAMA DE LA PLACA PARA ENCONTRAR LA DILUCION OPTIMA DEL CONJUGADO

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C	X						X					
D	-						-					
E	-						-					
F	X						X					
G												
H												

A1, B1 "POZOS BLANCOS"

TESTIGOS:

C1, C7, F1, F7 TESTIGOS PARA DETECTAR LA UNION INESPECIFICA DEL CONJUGADO (X)

D1, D7 SUEROS TESTIGO POSITIVOS (+)

E1, E7 SUEROS TESTIGO NEGATIVOS (-)

MUESTRAS:

G1, H1 SUERO PROBLEMA

C2, D2 SUERO PROBLEMA

ETC.

FIG. 3 ESQUEMA DE LA PREPARACION DE LAS PLACAS EN LA TECNICA DE ELISA.