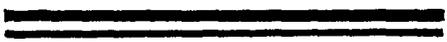


4  
2 ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN



V N A M

ELABORACION DE DIFERENTES ANTIGENOS  
DE BRUCELLA OVIS PARA EL DIAGNOSTICO  
SEROLOGICO DE LA BRUCELLOSIS OVINA

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO  
P R E S E N T A  
FRANCISCO ALVAREZ LOPEZ

DIRECTOR DE TESIS :  
QFB. M<sup>a</sup> DE LOURDES ONTIVEROS CORPUS.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO. 1993



## **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.

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

INDICE DE CUADROS.

Cuadro N <sup>o</sup> .	Página.
1. Total de sueros ensayados en las pruebas de fijación de complemento, inmunodifusión y Coombs. Reactores - positivos y negativos. . . . .	25
2. Análisis de $X^2$ para las pruebas de fijación de complemento y Coombs.. . . .	25
3. Análisis de $X^2$ para las pruebas de fijación de complemento e inmunodifusión. . . . .	26
4. Análisis de $X^2$ para las pruebas de Coombs e inmunodifusión. . . . .	26
5. Eficiencia en la combinación de dos pruebas. . . . .	27

## RESUMEN.

En el año de 1887, David Bruce aisló e identificó a la primer bacteria de este género, la Brucella melitensis. Desde entonces se han ido descubriendo otras especies, hasta completar un grupo de 6, denominadas: Brucella abortus, Brucella suis, Brucella neotomae, Brucella canis y Brucella ovis.

De las 6 Brucellas conocidas hasta la fecha, la Brucella neotomae, parece ser la única bacteria que no tiene importancia en los procesos infecciosos o por lo menos no se ha podido establecer relación. Las demás si tienen gran importancia. Por ejemplo: La Brucella abortus y la Brucella suis afectan a bovinos, caninos, equinos, humanos, ovinos y porcinos. La Brucella melitensis afecta a las especies mencionadas exceptuando a los equinos. La Brucella canis afecta a caninos y humanos, la Brucella neotomae afecta a la rata. Además, se han visto otros animales domésticos y silvestres, afectados por las Brucellas.

Particular importancia toma la Brucella ovis, bacteria que produce la epididimitis del carnero o brucellosis ovina, enfermedad que se caracteriza por su desarrollo patológico en el epididimo de los carneros, a tal grado que les origina esterilidad. En menor frecuencia, afecta a las ovejas provocándoles aborto, placentitis, nacimiento de corderos débiles o esterilidad de tipo infeccioso.

Para establecer la infección por esta bacteria, es necesario: El diagnóstico clínico, pruebas serológicas, aislamiento e identificación de la bacteria, debido a las características de la enfermedad.

Las pruebas serológicas muestran algunos inconvenientes, tales como: La presencia de anticuerpos "incompletos" en los carneros, ganado vacunado, pruebas muy laboriosas, abundante material parte de este de difícil adquisición y elaboración de antígenos de excelente calidad.

Por tal motivo, el objetivo de este trabajo fué la elaboración de antígenos de Bruceella ovis e implementar la técnica de Coombs, que es específica para detectar anticuerpos "incompletos".

## I. INTRODUCCION.

### BREVES ASPECTOS DEL GENERO BRUCELLA.

David Bruce fué quien aisló e identificó a la Brucella melitensis, primer bacteria de este género en conocerse, se aisló en el año de 1887, del bazo de pacientes muertos de "fiebre gástrica" o "mediterranea", más tarde llamada "fiebre de Malta". Afecta a los humanos, bovinos, caprinos, ovinos y porcinos. Su distribución es mundial e irregular, siendo mayor en zonas donde se cria ganado caprino, en la actualidad se conocen 3 biotipos. (33,68)

Frederik Bang, en el año de 1897, aisló e identificó a la Brucella abortus, de los fetos bovinos abortados y de las membranas fetales. Esta bacteria afecta al humano, equinos, bovinos, caprinos, ovinos y caninos. Su distribución en el mundo es amplia. En la actualidad se conocen 9 biotipos. (5,39)

Jacob Traum, en el año de 1914, aisló e identificó a la Brucella suis, de fetos porcinos abortados. Esta bacteria afecta al humano, equinos, porcinos, caprinos, bovinos, ovinos, caninos y aves. Se encuentra irregularmente distribuida en el mundo. En la actualidad se conocen 4 biotipos. (68)

La Brucella neotomae fué aislada en el año de 1957, a partir de la rata del desierto Neotoma lepida. Aún no se establece la importancia de esta bacteria en los procesos infecciosos. Parece ser que su distribución mundial es limitada, se ha reportado en el este de Estados Unidos, en focos naturales. (67)

La Brucella canis afecta al perro y al humano. Se ha comprobado su existencia en Estados Unidos, Brasil, Alemania, Japón y Madagascar, su distribución es cosmopolita. (7,39,41)

Además de las especies mencionadas, las Brucellas pueden afectar a mamíferos domésticos como: Búfalo, yaks, camello, dromedarios y alpaca. A igual que ciertos animales silvestres, como: Roedones, liebre, caribú, zorro, hurón, antillo

pe, bisonte americano y artrópodos como la garrapata. En pocos casos afecta a aves domésticas y aves libres como el cuervo y la conneja. (5,41,75)

Los reservorios naturales de Brucella abortus, Brucella suis y Brucella melitensis, son los bovinos, los porcinos, los caprinos y los ovinos. El huésped natural de la Brucella canis es el perro y el de la Brucella ovis es el ovino. (41,67,75)

Las Brucellas pueden presentar variaciones morfológicas de sus colonias denominadas: Lisas "S" y rugosas "R", con tipos intermedios entre la transición de "S" a "R" con aspectos semejantes a ambos extremos y que son conocidas como: "SI<sub>1</sub>", "SI<sub>2</sub>", "SI<sub>3</sub>", las cuales pueden pasar a colonias mucoides "M", a este fenómeno de mutación se le llama disociación. (29,68)

Las colonias lisas son pequeñas, circulares, convexas, brillantes o ligeramente opacas y el color oscila entre el azul y azul verdoso. Las colonias rugosas son circulares, convexas, opacas, de aspecto granular, de color que va de amarillo rojizo al blanco amarillento. Las colonias intermedias son muy difíciles de reconocer. Las colonias mucoides son opacas y grisáceas, pueden distinguirse por su consistencia viscosa, muy perceptible cuando se toca con una aguja o una asa. (6,68,85)

Las colonias de Brucella melitensis, Brucella suis y Brucella abortus cuando se presentan en fase lisa, tienen los antígenos A, M, Z y R, en diferentes proporciones. Cuando se presentan colonias en forma rugosa, contienen el antígeno R con o sin el antígeno Z. La Brucella ovis y la Brucella canis, solo se presentan en forma rugosa. La Brucella neotomae por lo general, se aísla en forma lisa. En el caso de las Brucellas que presentan el fenómeno de disociación, se ha notado que en fase lisa son más patógenas y virulentas que en fase rugosa. (65)

Las Brucellas se pueden sembrar en medios conocidos como básicos, entre

los que se encuentra el agar dextrosa con suero, agar triptosa con suero y agar tripticasa soya, entre otros. Para los casos en que la bacteria está contaminada por otros microorganismos o se sospecha de ello, se utilizan medios selectivos, que son los medios básicos más antibióticos, como la ciclohexamida, que es un fungistático; bacitracina para contrarrestar a las bacterias Gram positivas y polimixina B, activa contra las bacterias Gram negativas. (8,17)

Para su cultivo se toman muestras dependiendo de la especie animal, como puede ser: Leche, exudado vaginal, semen, sangre, membranas; de los fetos abortados se utilizan fragmentos de pulmón, hazo y contenido del estómago. De animales sacrificados, como de una a otra especie varía ligeramente la predilección de las Brucellas por los diferentes tejidos. Se presenta una lista de los tejidos más importantes de las especies animales que se recomiendan para su cultivo.

Ganado vacuno: Ganglios linfáticos supramamarios, retrofaringeos, iliacos internos y lumbares, tejido esplénico, tejido de cada pezón de la ubre y un fragmento del útero. (67)

Ganado ovino y caprino: Ganglios linfáticos supramamarios, submaxilares (o retrofaringeos) e iliacos internos, un fragmento de las porciones derecha e izquierda de la ubre, un fragmento del útero y un fragmento de hazo. (67)

Ganado porcino: Ganglios linfáticos mandibulares, gastrohepáticos, iliacos internos y suprafaringeos. (8,67)

#### ASPECTOS DE LA BRUCELLA OVIS.

Se han reportado varios casos de brucellosis ovina. Simmons y Hall publican un caso en 1953, ocurrido en Australia y describen a la bacteria causante como un microorganismo parecido a la Brucella (Brucella-like). (72)

Buddle y Boys en el mismo año reportan un caso ocurrido en Nueva Zelanda y describen al microorganismo como una Brucella (mutante). Buddle reporta, en el

año de 1956, y describe a la bacteria como una nueva especie de Brucella, a la que nombró Brucella ovis. El Subcomité de Taxonomía de las Brucellas, aceptó en forma oficial este nombre en 1965. (19,20)

Hay muchos casos reportados como el ocurrido en Estados Unidos en 1956, Argentina en 1961, Uruguay en 1966, Chile en 1989. (25,49,79,80)

En México se realizaron estudios en los cuales se intentó demostrar la presencia de Brucella ovis. Se efectuaron exámenes de tipo clínico, bacteriológico y serológico en diversos rebaños de ovinos Tabasco, localizados en diferentes regiones del país, también se examinaron muestras tomadas en el rastro de Ferreteria. No fué posible encontrar animales con manifestaciones clínicas o lesiones macroscópicas sugestivas de la epididimitis causada por Brucella ovis. Tampoco fué posible aislar el microorganismo en cuestión de las muestras trabajadas, pero se logró determinar la presencia de los anticuerpos específicos contra la Brucella ovis. (74)

Fuó hasta el año de 1979 cuando se publicó el primer reporte de aislamiento de Brucella ovis en México. Esto se logró a partir de uno de los borregos de raza Suffolk, que fueron importados en 1977 e introducidos a un rebaño en el estado de Guanajuato. (62)

La Brucella ovis presenta las siguientes características: Es un cocobacilo Gram negativo, se observa aislado y muy raramente en cadenas cortas, sus medidas van de 0.1 a 0.5 micras por 0.3 a 1.5 micras. No son encapsulados ni forman esporas, no son móviles. Forman colonias circulares, con margen entero circular, convexas con superficie lisa brillante, con el centro opaco y la superficie translúcida. Es una bacteria intracelular facultativa y anaerobia facultativa. La temperatura óptima para su crecimiento es de 37°C y el pH de 6.6 a 7.4. Es necesario agregar de 5 a 10% de CO<sub>2</sub> a la atmósfera donde se incuba, además de que el

medio donde se siembra debe ser enriquecido con 5% de suero de bovino, las colonias pueden observarse a las 72 horas. Los medios para sembrar a la bacteria son básicos como la tripticasa soya agar, agar Brucella y agar papa entre otros. En caso de contaminación o sospecha de ello se puede utilizar un medio selectivo. (29,41)

Esta bacteria no produce  $H_2S$ , crece en presencia de los colorantes fushina básica en concentraciones de 1:50,000 y 1:100,000; en tionina además en la concentración de 1:25,000, prueba en agar Albimi o agar triptosa. No es destruida por el brucelófago 7b. Se sometió a diferentes pruebas bioquímicas, obteniéndose los siguientes resultados: Leche tonnasol, después de 21 días no mostró cambio, los nitratos no fueron reducidos, el indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer, amonio, ureasa, oxidasa, utilización de citrato y hemólisis en agar sangre resultaron negativas. La prueba de catalasa fué marcadamente positiva. También se sometió a la prueba de los siguientes carbohidratos: Sucrosa, lactosa, maltosa, glucosa, galactosa, xilosa, levulosa, manosa, arabinosa, manitol, dulcitol, sorbitol, salicín, inositol y rafinosa. Estos fueron incubados durante 21 días, después de los cuales ninguno mostró rasgos de haber sido utilizado. (29,46,49)

La Brucella ovis sólo se presenta en forma rugosa, carece de los antígenos A y M que sí contienen las colonias lisas, únicamente tiene los antígenos Z y R. Por esta razón solo presenta aglutinación cruzada con la Brucella canis y con las variantes rugosas de las otras especies de Brucellas. Estos antígenos son lipopolisacáridos, que al ser sometidos a un análisis químico se pudo establecer que están formados por un polisacárido ( que a su vez está compuesto por glucosa, glucosamina y un azúcar no identificado), lípidos, proteínas y un ácido llamado KDO (ácido 2 ceto-2 deoxioctulosónico). (3,37,38,65,76)

Riezu-Boj, en su trabajo publicado en 1986, supone que las proteínas ex-

teriores de la membrana, lipopolisacridos y proteínas citoplasmáticas, son anti-  
genos cuya importancia debe ser establecida para las pruebas de diagnóstico en  
infecciones causadas por Brucella ovis. (66)

Un estudio hecho de los polinucleótidos del ácido desoxirribonucleico  
del género Brucella demostró una homología completa entre la Brucella abortus,  
Brucella melitensis, Brucella suis y Brucella neotomae, posteriormente se demos-  
tró la homología de la Brucella canis. El ácido desoxirribonucleico de la Bruce-  
lla ovis mostró que faltan ciertas secuencias de polinucleótidos comunes a las  
demás especies del género, al parecer por una mutación cromosómica. La mayor par-  
te de los polinucleótidos de la Brucella ovis son análogos a las demás especies  
de Brucella. (44,45)

#### EPIDIDIMITIS DEL CARNERO O BRUCELLOSIS OVINA.

Los síntomas de la enfermedad son fiebre (40-42°C), depresión y aumento  
de la frecuencia respiratoria. Los corderos de 4 meses son susceptibles a la in-  
fección y esta aumenta con la pubertad (a los 6 meses), los más comunmente afec-  
tados son los carneros sexualmente maduros. (15,49,52)

Descripción de lesiones macroscópicas: La Brucella ovis produce la en-  
fermedad conocida como brucelosis ovina o epididimitis del carnero. Los machos  
son muy susceptibles a esta enfermedad, que puede manifestarse uni o bilateralmen-  
te. En casos de animales con lesiones de epididimitis unilateral, hay mayor dege-  
neración en el testículo ipsilateral que en el testículo contralateral. Se presen-  
ta un agrandamiento de la cola del epididimo, con cambios en la túnica vaginal o  
sin ellos y cambios secundarios en el testículo y en la parte próxima del epididi-  
mo. El agrandamiento de la cola del epididimo varía en grado, desde cambios vaga-  
mente perceptibles hasta un aumento en tamaño de 4 a 5 veces. La porción de la  
glándula es firme, uniformemente dura, y el contorno globular normal se torna i-

irregular, está infiltrado con tejido conectivo blanco fibroso. La endidura normal que separa a la cola y cabeza del epididimo, frecuentemente está obliterada. La túnica albugínea aumenta su densidad con tejido conectivo grueso. La degeneración testicular es una característica variable en la enfermedad en los casos en que hay adhesiones ampliamente diseminadas, la degeneración es más grave. Comúnmente la gran mayoría de las glándulas experimenta atrofia, estancamiento de esperma, granulomas intratubulares y calcificación con fibrosis circundante. (14,43,45)

Descripción de las lesiones a nivel histológico: El epitelio del conducto epididimal se vuelve hiperplásico y presenta un número pequeño de quistes intraepiteliales. En la reacción inflamatoria del intersticio existe edema, histiocitos y un número pequeño de células inflamatorias dispersas en todo el intersticio y localmente agregadas alrededor de los vasos sanguíneos. Los vasos sanguíneos suplen el conducto epididimal, el conducto epididimal contiene un pequeño número de células multinucleadas pero pocos espermatozoides, la reacción inflamatoria que envuelve al conducto epididimal es supurativa. El epitelio seminífero tiene lesiones degenerativas, la reacción inflamatoria intersticial en los vasos deferentes no es tan severa como en la cola del epididimo, sin embargo, el epitelio está tan alterado como lo está el epitelio del conducto epididimal. (15,18,49,52,71)

Se colectaron muestras de semen por electroeyeculación para su exámen encontrándose las siguientes características: El color que presentó fué variado, desde un color claro pasando por lechoso, hasta un color crema. La motilidad y el número normal de espermatozoides disminuyeron conforme la infección se fué estableciendo, hasta llegar a la aspermia. Hubo anomalía en la forma y tamaño de la cabeza de los espermatozoides, también se encontraron cabezas sueltas, anomalías en la cola, cambios en el acrosoma y gotas citoplasmáticas. Se localiza-

non células inflamatorias, la mayor parte de estas son leucocitos polimorfonucleares y en menor cantidad leucocitos mononucleares. Además se pudo observar a la bacteria en el semen de varios carneros, resultando positivos al cultivo. (2,22,24,82)

Aunque esta es una enfermedad característica de los machos, también afecta a las hembras, solo que en forma menos severa. En las hembras no grávidas la enfermedad es de carácter pasajero, se produce esterilidad de tipo infeccioso. En las ovejas grávidas, el aborto o nacimiento de corderos muertos o débiles se acompaña de placentitis. (15,23,49,52,77)

Descripción de lesiones macroscópicas: Hay edema del coriolantoides y el corion intercotiledonario se encuentra cubierto con un exudado blanco o amarillento y pegajoso. En casos avanzados el exudado puede ser de color café rojizo con puntos amarillos, que se encuentran dispersos o en los focos necróticos del corion, el cual se torna hiperémico, duro y arrugado. (2,15,49)

Descripción de las lesiones a nivel histológico: Hay infiltración celular del estroma, presencia de células plasmáticas en ganglios y bazo, necrosis extensiva epitelial de los cotiledones y edema. Además, invasión de bacterias en el interplacentoma y en la zona hiliar del placentoma como en el epitelio del corion. La Brcella ovis persiste poco tiempo en la oveja y generalmente se elimina antes del siguiente alumbramiento. (23,55,77)

#### EVALUACION DE INMUNOGLOBULINAS.

Se han obtenido notables progresos en el estudio de las inmunoglobulinas (Ig) en diversos aspectos: Naturaleza, estructura, formación y factores que influyen en su elaboración y persistencia; lo que nos ha permitido elaborar un método de definición y nomenclatura. La situación no es tan clara en las especies animales, pero debido a que algunas inmunoglobulinas animales presentan fuentes seme-

zanjas a las clases de inmunoglobulinas humanas se ha tratado de darles las mismas designaciones. (30,42,43,60)

De manera general, los anticuerpos de gran peso molecular, cuya constante de sedimentación en la ultracentrifugación se aproxima a 19S, sensibles al mercaptol-2-etanol y similar a la IgM humana, se designan con el nombre de IgM. Los anticuerpos con una constante de sedimentación próxima a 7S y que son generalmente insensibles al mercapto-2-etanol, semejantes a la IgG humana, se les denomina IgG. También se toman en cuenta características como similitud de movilidad electroforética, contenido de carbohidratos y lugar de secreción. Aunque hay otro tipo de inmunoglobulinas, su relación con las del hombre no ha sido aclarada. (29)

En el carnero se han encontrado las siguientes inmunoglobulinas: IgG, se han descrito dos clases antigénicamente próximas, IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2</sub> y una subclase la IgG<sub>1a</sub>, esta última puede ser análoga a la IgE humana. También se encontró IgA e IgM. (30,42,43,60)

Se efectuó una valoración de inmunoglobulinas en carneros infectados naturalmente con Bruceella ovis, obteniéndose los siguientes resultados: La concentración de IgA en semen y fluido de glándulas sexuales accesorias es alta,  $5.03 \pm 1.78$  mg/ml. y  $9.18 \pm 7.28$  mg/ml., respectivamente, (media  $\pm$  desviación estándar); su nivel es mucho más alto que los niveles reportados en carneros no infectados. En suero,  $0.78 \pm 0.55$  mg/ml. y fluido de testículo y epidídimo  $0.59 \pm 0.78$  mg/ml. la concentración de IgA en comparación es baja. La concentración de IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> e IgM es baja en todos los fluidos genitales (semen, fluidos de glándulas sexuales accesorias, prepucio, testículo y epidídimo), no hay diferencia significativa con lo reportado en carneros no infectados. Esto nos indica que en la infección por Bruceella ovis resulta una pronunciada respuesta de IgA en secreciones, principalmente de glándulas sexuales accesorias. (40)

En el hombre y en algunos animales, en particular el carnero, se observan anticuerpos no aglutinantes o "incompletos", sobre todo en los casos crónicos y que únicamente pueden descubrirse con la prueba de la antiglobulina (prueba de Coombs). Probablemente no tiene poder aglutinante debido a su tamaño, forma y como consecuencia de protuberancias que pueden existir en las proximidades de la superficie de los antígenos a los que llegan a fijarse, son estéricamente incapaces de poder unir dos células juntas. Es probable también que las inmunoglobulinas sean incapaces de extender su pieza Fab lo suficiente para permitir que los lugares de combinación se fijen a las diferentes células de manera que se unan y comiencen la reacción de aglutinación. Para el diagnóstico de la epididimitis del carnero por Brucella ovis, las pruebas preferidas son la difusión en gel y la fijación de complemento, en estas dos pruebas se detecta la inmunoglobulina IgG, IgM e IgG<sub>1</sub>. (73)

#### VIAS DE ELIMINACION DE LA BRUCELLA OVIS.

Las vías de eliminación de la Brucella ovis son: Cubiertas fetales, líquido amniótico y feto, secreciones vaginales que fluyen tras el aborto, excremento del recién nacido, leche; en casos de afección renal, están en orina. Al principio de la enfermedad hay muchos microorganismos en el semen, después disminuyen y la mayoría de los casos acaba por desaparecer totalmente, numerosos carneros sin lesiones palpables continúan excretando la bacteria durante meses o años, las heces y secreciones nasales generalmente son pobres en bacterias. (2,32,63,67)

#### FORMAS DE TRANSMISION DE LA BRUCELLA OVIS.

Las vías de entrada del microorganismo son: Vía oral al ingerir alimentos o tomar agua contaminados. Los genitales externos al tener contacto prepuccial directo entre un carnero portador de gérmenes con un carnero sano, o al tener contacto rectal; al contaminar a la oveja durante el apareamiento, la contaminación

del macho por la oveja es rara; por piel con solución de continuidad. Es probable por vía conjuntival. Experimentalmente se ha logrado la infección por vía intravenosa, subcutánea, oral, conjuntival e intrauterina. (24,32,63)

En general, desde la puerta de entrada, que suele ser vía digestiva, las Brucellas ingresan en el organismo a través del intestino o de la cavidad faríngea, quedando retenidas en los ganglios linfáticos (retrofaringeos y mesentéricos) temporalmente. De ahí pasan a sangre, algunos microorganismos son destruidos y otros se llegan a establecer en tejidos de poca circulación como las vainas sinoviales, en algunos ganglios linfáticos, tejido mamario, testículo, epididimo, vesículas seminales y próstata, en donde la cantidad de CO<sub>2</sub> es mayor, situación que les favorece para el crecimiento. En caso de gestación invaden espacio interplacentario, así como intestino y estómago del feto. Se ha llegado a comprobar la existencia de la bacteria en otros tejidos como: Hígado, riñón y pulmón. (67)

#### DIAGNOSTICO.

Clinicamente, la enfermedad se diagnostica mediante la palpación de los epididimos. Por detras del animal se sujetan los dos testiculos, palpándolos simultáneamente y se compara la simetría de su tamaño, su forma y consistencia. La inflamación de un epididimo se manifiesta por aumento de volumen, ligero o acentuado y mayor consistencia (firme y hasta duro) según la edad de la lesión y la cantidad de tejido fibroso presente. Este método tiene el inconveniente de no poder diferenciar a la epididimitis causada por Brucella ovis de otras formas de epididimitis clinicamente análogas, provocadas por otros microorganismos. La Brucella ovis y el Actinobacillus ovis son las bacterias que más frecuentemente se han relacionado con la epididimitis. (16,35,36,48,70)

No obstante se han podido identificar gran número de microorganismos causantes de epididimitis, como son: Actinobacillus actinomyceten comitans, Alcali-

genes fecalis, Acinetobacter wolffi, Bacillus spp, Bacteroides spp, Brucella abortus, Corynebacterium ovis, Corynebacterium pyogenes, Corynebacterium spp, Escherichia coli, Haemophilus spp, Histophilus ovis, Moraxella spp, Pasteurella multocida, Pasteurella pseudotuberculosis, Pseudomona aeruginosa, Pseudomona maltophilia, Pseudomona pseudomalei, Pasteurella spp, Salmonella arizonae, Staphylococcus spp, Streptococcus spp. (4,10,11,12,21,51)

Se han reportado carneros que excretan microorganismos en el semen, aun cuando el exámen por palpación demuestran normalidad. Además, las lesiones crónicas pueden regresar a un estado tal, que no se pueden detectar por palpación. Esto nos demuestra que utilizando solamente el exámen clínico, no podemos obtener un diagnóstico 100% seguro. (82)

También se han utilizado procedimientos serológicos para diagnosticar esta enfermedad; entre las pruebas que se han usado se encuentran las siguientes: Fijación de complemento, es la prueba estándar para el diagnóstico de infección en carneros por Brucella ovis. En recientes investigaciones demostró ser una prueba casi perfecta ya que se ha logrado una sensibilidad de 96.3% y una especificidad de 99.3%. Con esta prueba se detecta la IgG, principalmente, y en menor grado IgM. Sin embargo, no puede ser usada con suero anticomplementario o hemolizado, además de que los carneros infectados crónicamente algunas veces dan resultados negativos, otras desventajas son que el calor de inactivación podría destruir algunos anticuerpos como los que están asociados con los primeros estadios de la infección y los post vacunales; necesidad de personal especializado y el tipo de material como espectrofotómetro, micropipetas, reactivos de difícil adquisición como el fenobarbital. (26,31,46,78,86)

Prueba de Coombs. Los anticuerpos IgG contra Brucella con frecuencia fallan para producir una aglutinación eficaz, por lo que son conocidos como "incom-

pletos". Para solventar este problema, se desarrolló una prueba serológica conocida como prueba de Coombs, en la cual se ha logrado una elevada sensibilidad y especificidad, es una prueba cuantitativa, muy útil sobre todo en casos crónicos, en donde más frecuentemente se encuentran anticuerpos "incompletos". (8,29,83)

Prueba de inmunodifusión. Es el método conveniente para ser utilizado en el campo, donde no están disponibles las facilidades de un laboratorio para efectuar la prueba de fijación de complemento. En la inmunodifusión se detecta IgG y se ha logrado una sensibilidad de 91.7% y especificidad del 100%. Esta prueba la puede aplicar personal con el mínimo de adiestramiento, además tiene la ventaja de ser económica y no utilizar mucho tiempo en su aplicación. (56,57,58,86)

Además de las pruebas mencionadas se han aplicado otras como: Prueba de ELISA, inhibición de la hemaglutinación, inmunofluorescencia, inmunoelectroforesis. (32,33,59,73,82)

Otro aspecto importante que se tiene que cumplir en el diagnóstico serológico, es la elaboración de antígeno de excelente calidad. De este modo se han probado antígenos elaborados de diferentes maneras como: Antígeno extraído en solución salina caliente, antígeno extraído por sonicado, antígeno extraído con solución de éter-cloroformo-fenol, antígeno extraído con desoxicolato de sodio, antígeno extraído con solución de litio-EDTA, antígeno extraído por agitación, antígeno de célula completa. Se han reportado antígenos con actividad anticomplementaria debido a células completas o restos de células, por lo tanto no se pueden usar en la prueba de fijación de complemento. También se ha reportado antígeno sonificado que tiene reacción cruzada con sueros de carneros infectados o inmunizados por otras especies de Brucellas. Los reportes de diversos estudios han demostrado que los antígenos dan mejor resultado cuando son elaborados a partir de cultivos que han sido recientemente aislados, ya que se tiene mayor sensibilidad y especifici

cidad, que cuando se elaboran de cepas viejas de laboratorio. Otro aspecto que se ha observado es que el antígeno es más estable cuando se utiliza una mezcla de suero de cabayo y solución salina, que cuando solo se utiliza solución salina. Desafortunadamente los métodos serológicos, no pueden darnos un diagnóstico 100% confiable, ya que algunos carneros infectados pueden dar resultados serológicos negativos. (9,13,27,64)

El aislamiento y la identificación del germen constituyen el único método de diagnóstico exento de error, sin embargo los resultados negativos del cultivo de semen no basta para descartar la infección por Brucella ovis. En algunos casos de animales con infección crónica, la bacteria puede no aparecer en el semen o encontrarse en el periodo intermitente, además de que puede ser difícil obtener muestras de semen no contaminadas con otros gérmenes cuyo desarrollo sea superior al de la Brucella ovis. Se puede intentar la localización de células inflamatorias y efectuar una valoración de la calidad del semen. (8,68)

Tomando en cuenta las desventajas que presentan los métodos de diagnóstico, lo mejor para lograr tal fin es combinando la exploración clínica, pruebas serológicas y cultivo del microorganismo. Es deseable contar con una historia clínica del rebaño, pues en esta, se puede encontrar datos como: Incidencia de la enfermedad en la región y en el rebaño, procedencia del ganado nuevo, si se les aplicó algún examen al comprarlos o no, que tipo de vacuna en caso de haber aplicado alguna. (8,63)

#### TRATAMIENTO.

Se han reportado varios tratamientos como: Tetraciclina a razón de un gramo al día, durante 20 a 30 días, en caso precoz. También se puede dar tratamiento con la combinación de clorotetraciclina, 800 miligramos vía intravenosa más estreptomycinina, un gramo vía subcutánea, inyectada durante 21 días. Oxitetra-

ciclina de acción prolongada cada 3 días durante 24 días. El antibiótico anterior más sulfato de dihidroestreptomicina por 21 días. Oxitetraciclina de acción prolongada por 15 días más dihidroestreptomicina por 7 días. Y oxitetraciclina convencional más dihidroestreptomicina por 7 días. El tratamiento se debe iniciar antes de que aparezcan lesiones irreversibles y se recomienda utilizar antimicrobianos que tengan la capacidad de penetrar en las células infectadas. Se puede usar un solo antibiótico pero es preferible emplear una combinación de dos, ya que se tienen mejores resultados. (29,34,41,50)

#### CONTROL.

El control de la epididimitis del carnero se puede lograr por el conjunto de las siguientes medidas: Eliminación de los reproductores con lesiones reconocibles clínicamente, eliminación de los reproductores clínicamente normales que resulten positivos a la prueba de difusión en gel o a la de fijación de complemento, separación de los carneros jóvenes que aún no entran en servicio, de los machos adultos y vacunación de los animales no adultos destinados a sustituir a los animales enfermos. (67)

#### VACUNACION.

Se comprobó que al llevar a cabo un programa combinado anualmente que consiste en la rigurosa selección, separación de carneros clínicamente afectados y la vacunación apropiada del resto de los animales, se reduce significativamente la incidencia de epididimitis causada por Bruceella ovis. El programa debe incluir el remplazamiento por carneros de un año de edad que han sido vacunados a los 4 o 5 meses de nacidos. Para este fin se han empleado diferentes vacunas como: Vacuna de Bruceella ovis muerta y adsorbida en hidróxido de aluminio; se aplican 2 inyecciones con un intervalo de 3 a 6 semanas una de otra. (14,54)

Se ha comprobado que la inoculación simultánea de Bruceella ovis muerta

adsonbida en hidróxido de aluminio, con la cepa 19 de Brucella abortus produce un alto grado de inmunidad duradera. (28,47,53,84)

El uso de carneros vacunados con Brucella melitensis Rev 1, ha reducido la incidencia de epididimitis y al mismo tiempo ha aumentado el porcentaje de ovejas fecundadas. Otra vacuna que se ha experimentado es la vacuna de Brucella ovis con vitamina E como adyuvante, la cual incrementó más la respuesta humoral que las otras vacunas, sin embargo, la diferencia no tiene importancia estadística. El efecto que se logró con esta vacuna, es el temprano cambio de IgM por IgG, registrando en la prueba de fijación de complemento títulos de aproximadamente 100 veces más grande para IgM que para IgG. (1,6,86)

#### DISTRIBUCION DE LA BRUCELLA OVIS.

La Brucella ovis parece estar distribuida en todos los países donde la cría de ovinos es importante. Desafortunadamente, siendo México un país en donde la explotación de ovinos es mínima, se ha podido comprobar la existencia de esta bacteria. Se recurrió a la bibliografía para tener idea de la magnitud del problema creado por la Brucella ovis en el país, pero no se encontraron estadísticas publicadas al respecto, por lo tanto no se puede llegar a una conclusión. (29)

#### SITUACION ACTUAL DE LA OVINOcultura EN MEXICO.

La ovinocultura nacional no cumple con las funciones que corresponden al sector ganadero, las cuales influyen en el proceso de desarrollo nacional y que son las siguientes: Producir alimentos y materia prima en cantidad y calidad adecuadas a precios bajos. Proporcionar un nivel de ingresos deconosos a la población rural, que le permita mejorar su nivel de vida y generar ahorro para invertir en actividades intra o extrasectoriales. Obtener divisas con las que se pueda autofinanciar la actividad y ayudar a la industria. (61,69)

Esto se debe a que la ovinocultura es una de las ramas de la ganadería

nacional que ha recibido menos atención, fomento y apoyo, propiciando su atraso en comparación con otras especies y al presente parece como una empresa desorganizada y desorientada, que encara serios problemas de tipo socioeconómico, genético, nutricional, sanitario y de manejo de los animales como de los productos, reducida producción, baja productividad y defectuosa comercialización. Esto la ha imposibilitado para satisfacer el consumo del país y cada vez tiende a deteriorarse más. El ganado ovino nacional cuenta con 6,269,687 cabezas, reporte hecho en el año de 1983. (61,69)

Los productos fisiológicos de los ovinos utilizados por el hombre con fines económicos son muy variados. Los destinados a la alimentación humana como: Carne, grasa y leche que es más rica en principios nutritivos que la leche de vaca o cabra, además se puede utilizar para producir mantequilla o queso. Y los utilizados como materia prima para la industria como: Lana, piel y lanolina. Otra ventaja son las heces que se usan como fertilizantes. (61,69)

En la actualidad existen en México lanas importadas, que compiten con las nacionales en precio, superándolas en calidad. Este fenómeno implica serias responsabilidades si se toma en consideración que contamos con zonas sumamente grandes que se adaptan perfectamente a las necesidades de las especies y en donde inclusive, sería difícil aclimatar otro tipo de ganado para explotación. Tan sólo en llanuras y cerros se reportan 74,498,820 hectáreas de pastos. Con respecto al uso del territorio nacional la situación no ha cambiado mucho en los últimos años y se puede decir que México destinó el 51% de su superficie a la actividad ganadera. (61,69)

### I.1. HIPOTESIS.

Al someter a la Brucella ovis a una solución fenolada al 0.5%, durante 24 horas a temperatura ambiente queda inactivada, de esta manera es posible utilizarla como antígeno, ya que sus determinantes antigénicos no sufren alteración, presentándose una reacción de aglutinación al ponerlo en contacto con suero de ovino que de alguna manera haya desarrollado anticuerpos contra Brucella ovis.

Si calentamos a 80°C durante 30 minutos a la Brucella ovis en solución de desoxicolato de sodio al 1% y buffer de fosfatos, obtendremos un antígeno soluble que al poner en contacto con suero de ovino, que de alguna manera haya desarrollado anticuerpos contra Brucella ovis, veremos una reacción de precipitación.

Los anticuerpos (Ac) anti Brucella ovis, conocidos como "incompletos", no obstante que reaccionan con el antígeno (Ag), son incapaces de producir aglutinación, dando origen a un complejo Ac-Ag suelto (no aglutinado). Al agregar suero antiglobulina, se presenta la aglutinación, ya que dicho suero reacciona con el complejo Ac-Ag, específicamente con la parte Ac.

### I.2. OBJETIVO.

El objetivo del presente trabajo es la elaboración de un antígeno de células completas y un antígeno soluble a partir de una cepa de Brucella ovis 2775 patógena y su valoración por medio de las pruebas serológicas más comúnmente empleadas para el diagnóstico de la brucelosis ovina, como son fijación de complemento e inmunodifusión en gel. Implementar la prueba de anticuerpos incompletos de Coombs, para la detección de este tipo de anticuerpos en el suero de animales sospechosos de padecer dicha enfermedad. Así como someter los resultados a un análisis de  $\chi^2$  (Ji cuadrada) para comparar el comportamiento entre las pruebas Coombs-fijación de complemento, inmunodifusión-fijación de complemento y Coombs-inmunodifusión.

## II. MATERIAL Y TECNICAS.

### II.1. TECNICA PARA LA ELABORACION DE ANTIGENO DE CELULA COMPLETA.

De la semilla Brucella ovis cepa 2775, se efectuó una tinción de Gram para verificar su pureza. Hecho esto, se sembró en placas de agar tripticosa soya con 5% de suero de bovino, se incubaron con temperatura de 37°C más 10% de CO<sub>2</sub>. Después de 48 horas se revisaron, se efectuó una tinción de Gram para verificar la pureza de la bacteria. Ya verificada, se les agregó solución salina fenolada al 0.5% para inactivar a la bacteria, así se dejaron a temperatura ambiente durante 24 horas. Se cosecharon los microorganismos colectandolos en un frasco estéril después de lavar a la bacteria por 3 ocasiones, se resuspendió en solución salina. Se sembró el microorganismo para comprobar su inactivación, siendo positivo el resultado al no haber crecimiento. Se estandarizó a la bacteria por el método de \*Mc Farland a una concentración de  $1,800 \times 10^6$  microorganismos por mililitro. Se hicieron pruebas de aglutinación con 10 sueros positivos y 10 sueros negativos. Se efectuaron pruebas para determinar su sensibilidad. Se verificó su pureza con una tinción de Gram y se agregó a frascos viales estériles, los cuales se refrigeraron para su conservación, hasta el momento de ser utilizados. (\*81)

### II.2. TECNICA PARA LA ELABORACION DE ANTIGENO SOLUBLE.

Los cultivos de Brucella ovis de 48 horas, se cosecharon en solución buffer de fosfatos pH 7.2, después de verificar su pureza mediante una tinción de Gram, se filtró en gasa doble. Se formó un paquete de microorganismos centrifugando la suspensión a 3,000 rpm. Cada mililitro de células empaquetadas se resuspendió en 3 mililitros de buffer de fosfatos pH 7.2, el volumen se ajustó a 10 mililitros con solución de desoxicolato de sodio al 1%. Se calentó durante 30 minutos a 80°C, luego se centrifugó a 10,000 g durante 30 minutos, se colectó el sobrenadante, el cual se centrifugó a 20,000 g, durante 4 horas, colectando posterior-

mente el sobrenadante, para someterlo a una prueba de sensibilidad. Se determinó la concentración óptima para la prueba de inmunodifusión, 1:8. Se colocó en frascos viales estériles y se refrigeró para su conservación, hasta el momento de ser utilizado.

### II.3. TECNICA PARA LA ELABORACION DEL REACTIVO DE COOMBS.

Se agregaron 34.5 ml de una solución saturada de sulfato de amonio a 69 ml de suero de carnero y se dejó en agitación durante 24 horas a 4°C. Se centrifugó la mezcla a 3,000 rpm durante 10 minutos, el precipitado obtenido se disolvió en agua destilada. Se repite la centrifugación y la disolución, la cual se sometió a diálisis en solución salina al 0.85%. Se le cambió la solución salina cada 24 horas en 3 ocasiones. La globulina en solución se inoculó en forma intramuscular a 6 conejos, 6 dosis por conejo, una cada 7 días. En la primera se aplicó 0.5 ml de Adyuvante completo de Freund más 0.5 ml de solución de globulina las demás dosis fueron de 1 ml de solución de globulina. Siete días después de la última dosis se sangraron los conejos en blanco. Se separó el suero y se sometió a la prueba de Coombs para verificar su funcionamiento. Finalmente se envasó en frascos viales estériles, conservándolos en refrigeración hasta su uso.

### II.4. TECNICA DE COOMBS.

*Material biológico:* Suspensión normalizada de antígeno de Brucella ovis de célula completa estandarizada por el método de Mc Farland. Solución de gamma globulina a partir de suero de carnero. Reactivo de Coombs (suero anti-gamma-globulina).

*Método:* Se usaron 5 tubos por cada suero problema. Se efectuó una dilución seriada 1:2 hasta 1:80 usando solución salina fenicada como diluyente. Se agregó 0.5 ml de antígeno a cada tubo y se mezcló cuidadosamente. Se incubaron los tubos durante 20 horas a 37°C, después de lo cual se leyeron los resultados. Los sueros que presentaron aglutinación se desecharon, los negativos se centrifugaron duran-

te 20 minutos a 2,500 g, desechando el sobrenadante. Se suspendió el sedimento en solución salina normal, con un volumen igual al inicial, el lavado se repitió 2 veces más. Se resuspendió el sedimento en reactivo de Coombs, diluido 1:50. Se incubaron los tubos 24 horas a 37°C. Se leyeron los resultados.

Interpretación de los resultados: Se tomaron como positivos los sueros que mostraron aglutinación al final del último paso, en la dilución 1:40.

#### II.5. TECNICA DE FIJACION DE COMPLEMENTO.

Material biológico: Suspensión normalizada de antígeno de Brucella ovis, de célula completa estandarizada por el método de Mc Farland,  $1,800 \times 10^6$  microorganismos por mililitro. Solución salina normal amortiguada con barbital (veronal). Solución Alsever. Hematíes de carnero estandarizados al 3%. Hemolisina. Complemento de colayo.

Método: Se agregaron 25 microlitros ( $\mu\text{l}$ ) de diluyente (solución salina con barbital), con una pipeta de volumen constante, en cada uno de los 7 pozos de la placa de plástico, salvo en el primero de cada fila. Se agregaron 50  $\mu\text{l}$  de la dilución de suero inactivado de la muestra por analizar, en el primer y segundo pozo de cada fila de la placa, se usó una fila para cada suero problema. Se extrajo del segundo pozo 25  $\mu\text{l}$  y se agregaron al tercer pozo, se mezcló y extrajeron 25  $\mu\text{l}$ , se repitió la operación hasta el último pozo, de donde se extrajeron 25  $\mu\text{l}$  y se desecharon. Se agregaron 25  $\mu\text{l}$  de antígeno debidamente diluido en cada pozo salvo en el último, que sirvió de testigo para la actividad anticomplementaria del suero. Se agregaron 25  $\mu\text{l}$  de complemento en todos los pozos, se mezcló golpeado suavemente un lado de la placa. Se incubaron las placas durante 30 minutos a 37°C. Se agregaron 25  $\mu\text{l}$  de eritrocitos sensibilizados en cada pozo, es importante mezclar cuidadosamente los eritrocitos con los demás componentes y mantener la mezcla en suspensión. Se incubaron durante 30 minutos a 37°C, se agitaron a los 15 minutos

de incubación, después de lo cual se dejaron reposar 3 horas en el refrigerador, se leyeron los resultados.

Interpretación de los resultados: Se tomaron como positivos los sueros que presentaron un "botón" de eritrocitos (eritrocitos sedimentados), a partir de la dilución 1:4. Se tomaron como negativos los sueros que mostraron hemólisis.

## II.6. TÉCNICA DE INMUNODIFUSIÓN EN GEL.

Material biológico: Antígeno soluble de Bruceella ovis. Solución buffer de fosfatos pH 7.2. Amortiguador de boratos pH 7.2. Agarosa.

Método: Se disolvió el gel al vapor, se agregó un ml de azida de sodio y se mezcló. Se sirvió el gel en cajas Petri hasta un espesor de 4 mm. Ya solidificado se abrieron pozos al rededor de uno central, de 4 mm de diámetro y separados 5 mm entre sí. Se llenó el pozo central con antígeno diluido 1:8 en buffer de glicina pH 6.8. Se colocaron los sueros problema en los pozos de la periferia. Se incubaron en cámara húmeda a temperatura ambiente, durante 24 horas. Se leyeron en cámara de fondo obscuro y luz incidente. Se leyeron al cabo de 2 y 3 días.

Interpretación de los resultados: Se tomaron como positivos los sueros que mostraron líneas de precipitación (líneas que se marcan entre el gel).

Para las técnicas de fijación de complemento e inmunodifusión se probaron 874 sueros, para la técnica de Coombs se probaron 872 sueros, del rebaño del Centro Ovino del Programa de Extensión Agropecuaria, en el cual se encontraron animales de la raza Criolla, Cruza, Suffolk, Polled, Dorset y Tabasco, con 69.33% de hembras, 24.83% de machos y 5.83% de corderos. No vacunados y con antecedentes de un brote de brucellosis ovina en el año de 1984. Los sueros problema se mantuvieron a  $-70^{\circ}\text{C}$ , hasta el momento de ser utilizados. Se ocuparon 10 sueros positivos y 10 negativos como testigos. Las técnicas se efectuaron según Alton. (8)

### III. RESULTADOS.

Los sueros reactores positivos que se obtuvieron en las pruebas son: Fijación de complemento (FC) 262, inmunodifusión (ID) 115 y Coombs 273. Los sueros reactores negativos son: Fijación de complemento 612, inmunodifusión 759 y Coombs 599. Estos resultados se muestran en el cuadro Nº 1.

	Fijación de complemento.	Inmuno-difusión.	Coombs.
Reactores positivos.	262	115	273
Reactores negativos.	612	759	599
Total de sueros probados.	874	874	872
Dilución a la cual se consideraron positivos.	1/4	Única	1/40

Cuadro Nº 1. Total de sueros ensayados en las pruebas de fijación de complemento, inmunodifusión y Coombs. Reactores positivos y negativos.

Estos datos se sometieron a un análisis de  $\chi^2$  (ji cuadrada) del cual se obtuvieron los siguientes resultados que se muestran en los cuadros 2, 3 y 4.

	Observados.			Esperados.		
	FC.	Coombs.	Totales.	FC.	Coombs.	Totales.
Positivos.	262	273	535	267.80	267.19	534.99
Negativos.	612	599	1211	606.80	604.80	1210.99
	874	872	1746	873.99	871.99	1745.98

Cuadro Nº 2. Análisis de  $\chi^2$  para las pruebas de fijación de complemento y Coombs.

De tablas  $\chi^2_{0.01} = 6.63$  y como resultado tenemos que  $\chi^2 = 0.3631$ . Comparando estas cantidades tenemos que  $\chi^2_{0.01} > \chi^2$  por lo tanto no hay diferencia significativa importante.

	Observados.			Esperados.		
	FC.	ID.	Totales.	FC.	ID.	Totales.
Positivos.	262	115	377	188,5	188,5	377
Negativos.	612	759	1371	685,5	685,5	1371
	874	874	1748	874,0	874,0	1748

Cuadro N<sup>o</sup> 3. Análisis de  $X^2$  para la prueba de fijación de complemento e inmunodifusión.

Como resultado tenemos que  $X^2 = 73.06$ . Comparando tenemos que  $X_{0,01} < X^2$  por lo tanto si hay diferencia significativa importante.

	Observados.			Esperados.		
	Coombs.	ID.	Totales.	Coombs.	ID.	Totales.
Positivos.	273	115	388	194,22	194,22	387,99
Negativos.	599	759	1358	678,22	679,77	1357,99
	872	874	1746	871,99	873,99	1745,98

Cuadro N<sup>o</sup> 4. Análisis de  $X^2$  para las pruebas de Coombs e inmunodifusión.

Como resultado tenemos  $X^2 = 83.18$ . Comparando tenemos que  $X_{0,01} < X^2$  por lo tanto si hay diferencia significativa importante.

Otro análisis al que se sometieron los resultados, es al de la eficiencia. Como se puede observar en el cuadro N<sup>o</sup> 5, la eficiencia en la combinación de las pruebas fijación de complemento-Coombs, es próxima a lo ideal, en cuanto a las combinaciones inmunodifusión-Coombs y fijación de complemento-inmunodifusión, es aceptable.

	<i>Suma de reactores positivos Total de reactores en todas las pruebas</i>	<i>Eficiencia.</i>
<i>FC.-Coombs.</i>	440/482	91.29%
<i>ID.-Coombs.</i>	355/482	69.50%
<i>FC.-ID.</i>	331/482	68.67%

Cuadro Nº 5. Eficiencia en la combinación de dos pruebas.

Los resultados observados con el antígeno de células completas, usados en las técnicas de fijación de complemento y Coombs son: Un antígeno puro, no se detectó contaminación por algún microorganismo. Cuando se estableció la estandarización  $1,800 \times 10^6$  microorganismos por mililitro, y se estableció la dilución adecuada,  $1,200 \times 10^6$  microorganismos por mililitro, mostró un efecto aglutinante notable, ya que aglutinó con diferentes diluciones de los sueros positivos. Cuando se efectuaron las pruebas de Coombs y fijación de complemento con los sueros problema, el antígeno mostró poder aglutinante bueno. Por lo tanto la sensibilidad del antígeno es muy buena.

Los resultados observados con el antígeno soluble, usado en la técnica de inmunodifusión son: Un antígeno puro, con poder precipitante sobresaliente cuando se estableció la dilución adecuada, 1:8. Al efectuarse la prueba de inmunodifusión con los sueros problema, se obtuvo un resultado precipitante satisfactorio. Por lo tanto la sensibilidad del antígeno resultó buena.

#### IV. DISCUSION.

Observamos en los resultados, que la prueba de Coombs detectó más sueros reactores positivos, 273, esto se debió probablemente a la característica del anticuerpo "incompleto", que se desarrolla en el carnero y al reactivo tan especial que es usado en esta prueba, el reactivo de Coombs, que es un suero anti-gamma-

globulina el cual no es utilizado en otras pruebas. Además de que sabemos que se han reportado especificidad y sensibilidad altas en esta prueba. (8,83)

La prueba de fijación de complemento, es la segunda que más sueros reactivos positivos registró, 262. Como se sabe, en esta prueba se han reportado una \*sensibilidad de 96.3% y una \*especificidad de 99.3%. Esto nos hace pensar que los resultados con respecto a la prueba de Coombs deben ser mejores o muy semejantes. En este caso esa pequeña diferencia obtenida puede ser explicada si tomamos en cuenta que en la prueba de fijación de complemento se usan más reactivos y que esto aumenta el margen de error que se puede tener. (31,40,73,\*86)

En la prueba de inmunodifusión se han reportado una \*sensibilidad y una \*especificidad de 91.7% y 100% respectivamente. Lo que nos indica que se deben obtener resultados muy parecidos a los de las pruebas anteriores. Sin embargo vemos que solo se registraron 115 sueros reactivos positivos. Probablemente esto se debió a que la prueba de inmunodifusión tiene la característica de consumir bastante antígeno y anticuerpo para poder ser evidente la reacción, es decir, es menos sensible que las dos pruebas anteriores. Por otro lado, se utilizó una sola dilución de antígeno y los sueros problema que presentaron concentraciones de anticuerpo menores a la óptima, pudieron haber formado complejos solubles o reacción de precipitación no muy marcada; en el segundo caso si el antígeno sigue difundiendo tiende a desaparecer el precipitado. Por lo tanto sueros problema con cantidades pequeñas de anticuerpo pudieron haber presentado reacción positiva en las pruebas de fijación de complemento y Coombs, y negativa en la prueba de inmunodifusión. (56,57,58,\*86)

De los resultados mostrados podemos comentar que nuestro antígeno, tanto el de células completas como el soluble, reaccionaron satisfactoriamente a las pruebas de fijación de complemento, Coombs e inmunodifusión.

En el análisis de los datos por medio de  $\chi^2$  entre las pruebas de fijación de complemento y Coombs, cuadro N<sup>o</sup> 2, vemos que en el resultado no hay diferencia significativa importante. Entre las pruebas de fijación de complemento e inmunodifusión, cuadro N<sup>o</sup> 3, y las pruebas de Coombs e inmunodifusión, cuadro N<sup>o</sup> 4, vemos que si hay diferencia significativa importante. Lo que indica que el comportamiento de las pruebas, Coombs y fijación de complemento fué muy semejante. Y el comportamiento de la prueba de inmunodifusión fué diferente con respecto a las pruebas de Coombs y fijación de complemento.

En el cuadro N<sup>o</sup> 5, se presenta la eficiencia en la combinación de dos pruebas, observando que los resultados son buenos, en especial la combinación entre la prueba de Coombs y la de fijación de complemento, logrando 91.29% de eficiencia. En menor grado, pero aceptable es el resultado obtenido en la combinación de la prueba de inmunodifusión y Coombs, con un 67.50% de eficiencia. Muy semejante resultó la combinación de la prueba fijación de complemento e inmunodifusión, con 68.67% de eficiencia. (82)

Estos resultados sugieren que para fines prácticos, lo más adecuado es no trabajar con una sola prueba, sino tratar de complementar dos pruebas, estableciendo una correlación entre ellas para obtener mejores resultados. Esto se confirma con lo que menciona el Dr. Gustavo A. Rodríguez: "Ninguna prueba diagnóstica corriente basta por si sola para descubrir todos los animales infectados. Aun cuando se recurra a la totalidad de las pruebas diagnósticas de que actualmente se dispone, podrá ocurrir que se obtengan reacciones negativas en casos comprobados como positivos por aislamiento de la bacteria en cultivos". (67)

Comparando las técnicas en el aspecto de facilidad de montar la prueba y su ejecución, tenemos que la prueba de inmunodifusión, es la más rápida, tanto para montarse como para practicarla, recomendable para el campo donde no hay las

facilidades de un buen laboratorio. La prueba de Coombs es más difícil de montar y practicarla, además de que se requiere mucho más material que en la prueba anterior. Por último, la prueba de fijación de complemento, es la más difícil de las tres, con poca diferencia con respecto a la técnica de Coombs, aunque la prueba de fijación de complemento puede tener una dificultad adicional, que se puede originar por el hecho de tener que usar fenoharhital, que es una sustancia controlada por Salubridad y no es de fácil adquisición.

En cuanto al costo, tenemos que la prueba de inmunodifusión es la más barata, tanto en lo que se refiere al valor del material y reactivos, como al gasto por concepto de sueldos, ya que se efectúa en muy poco tiempo y no se requiere de personal muy especializado. La diferencia económica entre la prueba de inmunodifusión y la prueba de Coombs es muy marcada ya que se requiere mayor cantidad de material y reactivos, siendo estos más caros, hay que agregar que es más tardada en efectuarse y de requerir personal preparado lo que aumenta el gasto en sueldos. La de mayor costo es la prueba de fijación de complemento, por concepto de material, reactivos y sueldos por ser necesario personal muy calificado.

De la funcionalidad de los antígenos podemos decir que los resultados son satisfactorios en la estandarización, en las pruebas con los sueros problema y en la sensibilidad obtenida. En cuanto a su control de calidad, podemos calificarlo como muy bueno ya que no se detectó contaminación y se cumplió con otros requisitos como isotonicidad, pH, se mantuvieron a temperatura baja mientras no se utilizaban y las diluciones usadas fueron adecuadas para la prueba de aglutinación como para la prueba de precipitación y la de inhibición de la hemólisis.

## V. CONCLUSION.

*Del análisis de los datos obtenidos se concluye que los antígenos funcionaron correctamente (con lo cual queda demostrada la hipótesis), lo suficiente como para que se pueda pensar con la continuación en este tipo de trabajos, hasta obtener un nivel altamente satisfactorio.*

*De las tres pruebas, la de inmunodifusión en gel, es la más económica, más rápida y fácil de montar. La prueba de Coombs y fijación de complemento, resultan más costosas, más difíciles de montar y más tardadas en ejecutarse, notándose una leve diferencia a favor de la prueba de Coombs.*

*La falta de preparación y de elaboración de técnicas, así como los problemas originados por las enfermedades, entre otros problemas, han provocado que la ganadería ovina en México no se haya desarrollado como es deseable y necesario.*

*A pesar de lo crítico de la situación de la ovinocultura en México, todavía es posible rescatarla con planeación adecuada, que incluya programas sanitarios constantes y adecuados para controlar este tipo de enfermedades.*

## VI. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Afzal, M.; Tengerdy, R.P. Protection of rams against epididymitis by a Brucella ovis-vitamin E vaccine. Vet. Immunol. Immunopathol. 1984;7:293-304.
- 2.- Afzal, M.; Tengerdy, R.P. Immune in rams experimentally infected with Brucella ovis. Res. Vet. Sci. 1986;41:85-89.
- 3.- Afzal, M.; Scott, J. Isolation and antigenic reactivity of Brucella ovis outer membrane proteins. J. Clin. Microbiol. 1987;25:2132-2135.
- 4.- Ajai, C.O. Diagnosing ovine epididymitis by immunofluorescence. Vet. Record. 1980;107:421-424.
- 5.- Al-Khalaf, S. Brucellosis of camels in Kuwait. Agric. Affairs Fish Res. 1989;12(1-2):1-4.
- 6.- Alton, G.G.; Elberg, S.S. Rev. 1 Brucella mellitensis vaccine. Vet. Bull. 1967;37:793-799.
- 7.- Alton, G.G. Brucellosis as a human health hazard in Australia. Aust. Vet. J. 1974;50:209-215.
- 8.- Alton, G.G. Techniques for the brucellosis laboratory. Inst. Nat. Rech. Agr. Paris 1988;1-190.
- 9.- An Animal Health Division report. The complement fixation test for the diagnosis of Brucella ovis infection in rams. New Zeal. Vet. J. 1983;31:157-160.
- 10.- Bagley, C.B. Effect of epididymitis of semen quality of rams. JAVMA. 1984;185:876-877.
- 11.- Baynes, I.D.; Simmons, G.C. Ovine epididymitis caused by Actinobacillus seminis, n. sp. Aust. Vet. J. 1960;36:454-459.
- 12.- Beeman, K.B.; Hummels, S.; Rahaley, R. Epididymitis in rams. Vet. Med. Small Anim. Clinician. 1982;77:1647-1650.
- 13.- Biberstein, E.; McGowan, B. Epididymitis in rams studies on laboratory diagnosis. Cornell Vet. 1958;48:31-44.
- 14.- Biberstein, E.; McGowan, B.; Robinson, E. Epididymitis in rams studies on immunity. Cornell Vet. 1962;52:214-227.
- 15.- Biberstein, E.; McGowan, B.; Olander, H. Epididymitis in rams studies on pathogenesis. Cornell Vet. 1964;54:27-41.
- 16.- Briton, L.; Craddock, F. Ram epididymitis. A clinical report. Theriogenology. 1982;17:343-347.
- 17.- Brown, G.M.; Ranger, C.R.; Kelley, D.J. Selective media for the isolation of Brucella ovis. Cornell Vet. 1971;61:265-280.
- 18.- Brown, G.M.; Pietz, D.E.; Price, D.A. Studies on the transmission of Brucella ovis infection in rams. Cornell Vet. 1973;63:29-40.
- 19.- Buddle, M.B.; Boyes, B.W. A Brucella mutant causing genital disease of sheep in New Zeal. Aust. Vet. J. 1953;29:145-153.
- 20.- Buddle, M.B. Studies on Brucella ovis (n. sp.). A cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia. J. Hyg. 1956;54:351-364.
- 21.- Bulgin, M.S.; Anderson, B.C. Association of sexual experience with isolation of various bacteria in cases of ovine epididymitis. JAVMA. 1983;182:372-374.
- 22.- Bulgin, M.S. Brucella ovis excretion in semen of seronegative, clinically normal breeding rams. J. Am. Vet. Med. Ass. 1990;196(2):313-315.
- 23.- Bulgin, M.S. Brucella ovis epizootic in virgin ram lambs. J. Am. Vet. Med. Ass. 1990;196(7):1120-1122.
- 24.- Cameron, D.A.; Lauerman, L.H. The incidence of Brucella ovis in some Kenya flocks and its relationship to clinical lesions and semen quality. Vet. Rec. 1971;89:552-557.
- 25.- Casas, O.R.; Durán, C.A. La epididimitis infecciosa de los carneros por Brucella ovis. Primera comprobación en el Uruguay. Anu. Fac. Vet. Uruguay. 1966;11:71-91.
- 26.- Clapp, K.H. A complement fixation test for the diagnosis of ovine brucellosis with special reference to epididymitis. Aust. Vet. J. 1955;31:27-28.
- 27.- Clapp, K.H. A comparison of various antigens used in the complement fixation test for ovine brucellosis. Aust. Vet. J. 1961;37:188-190.
- 28.- Claxton, P.D. A comparison of two commercial vaccines and two methods of vaccination. Aust. Vet. J. 1968;44:48-54.
- 29.- Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Brucelosis. 6º informe. Geneva 1986.

- 30.- Curtain, C.C. A new immunoglobulin sub-class in the sheep. *Immunol.* 1969;16:373-379.
- 31.- Chand, P.; Sadona, J.R. Comparison of the dot-immunobinding assay with the complement fixation test for the detection of Brucella antibodies in sheep. *Vet. Microbiol.* 1989;20:281-287.
- 32.- Chin, J.C. Evaluation of surface components of Brucella ovis as antigens for the detection of precipitin antibody in serums from artificially exposed rams. *Aust. Vet. J.* 1983;60:264-267.
- 33.- Chin, J.C. Temporal ELISA response of rams a Brucella ovis following experimental infection or vaccination. *Res. Vet. Sci.* 1989;46(1):73-70.
- 34.- Dagartz, D.A.; Smith, J.A. Antimicrobial therapy for rams with Brucella ovis infection of the urogenital tract. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 1990;195(4):605-610.
- 35.- DeLong, W.J. Bacterial isolates associated with epididymitis in rams from Idaho and eastern Oregon flocks. *Am. J. Vet. Res.* 1979;40:101-102.
- 36.- DeVlett, J.A.; Erasmus, J.A. Epididymitis of ram in the central and southern districts of the Orange Free State. *J. S. Afr. Vet. Ass.* 1984;55:173-179.
- 37.- Días, R. Antigenic relationship of the Gram-negative organism causing canine abortion to smooth and rough Brucellae. *J. Bact.* 1968;95:618-624.
- 38.- Días, R.; Jones, L.M. Surface antigens of smooth Brucellae. *J. Bact.* 1968;96:893-901.
- 39.- Flores, C.R. Características de las Brucelas. *Memorias del Foro Nacional sobre Brucelosis*. INIP-ENEP. México, D.F. Dic. 1978; p. 1-6.
- 40.- Foster, R.A.; Ladds, P.W. Immunoglobulins and immunoglobulin-containing cells in the reproductive tracts of rams naturally infected with Brucella ovis. *Aust. Vet. J.* 1980;65:37-40.
- 41.- Hagan, W.A. *The infectious diseases of domestic animals*. Comstock Publishing Associates. Ithaca, New York. 1957. 3<sup>rd</sup> ed.
- 42.- Heimer, R. Immunoglobulins of sheep. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1969;131:9-17.
- 43.- Hogart, R.S. Homocytotropic antibody in sheep. *Immunol.* 1969;16:543-546.
- 44.- Hoyer, B.H.; McCullough, N. Polynucleotide Homologies of Brucella deoxyribonucleic acids. *J. Bact.* 1968;95:444-448.
- 45.- Hoyer, B.H. Homologies of deoxyribonucleic acids from Brucella ovis, canine abortion organism, and other Brucella species. *J. Bact.* 1968;96:1763-1790.
- 46.- Hughes, K.L.; Claxton, P.D. Brucella ovis infection. An evaluation of microbiological, serological methods of diagnosis in the ram. *Aust. Vet. J.* 1968;44:41-47.
- 47.- Hulse, E.C. Requirements for the production control of Brucella abortus (strain 19) vaccine. *International Symposium on brucellosis*. Tunis 1968;12:10-15.
- 48.- Jensen, R. *Diseases of sheep*. 2<sup>nd</sup> ed. Lea & Febiger. Phil. 1982 pag. 7-12.
- 49.- Kennedy, P.C.; Frazier, L. Epididymitis in rams. *Pathol. Mact. Cornell Vet.* 1956;46:303-319.
- 50.- Marin, C.M. Efficacy of long-acting oxytetracycline alone or in combination with streptomycin for treatment of Brucella ovis infection of rams. *Am. J. Vet. Res.* 1989;50(4):560-563.
- 51.- Mason, R.W. A Echerichia coli epididymitis in a Suffolk ram. *Aust. Vet. J.* 1982;50:172.
- 52.- McGowan, B.; Shultz, G. Epididymitis of rams. *Cornell Vet.* 1956;46:277-281.
- 53.- McGowan, B. Epididymitis in rams: Effect of vaccination and culling on the clinical incidence of the disease. *Cornell Vet.* 1979;69:67-72.
- 54.- McGowan, B. Epididymitis in rams: Studies on vaccine efficacy. *Cornell Vet.* 1979;69:73-76.
- 55.- Muhammed, S.J. Duration of Brucella ovis infection in ewes. *Cornell Vet.* 1975;65:221-227.
- 56.- Myers, D.M.; Siniuk, A.A. Preliminary report on the development of a diffusion-in-gel method for the diagnosis of ram epididymitis. *Appl. Microbiol.* 1970;19:335-337.
- 57.- Myers, D.M. Studies of antigens for complement fixation and gel diffusion tests in the diagnosis of infections caused by Brucella ovis and other Brucella. *Appl. Microbiol.* 1972;23:894-902.
- 58.- Myes, D. Field evaluation of the gel diffusion test for the diagnosis of ram epididymitis caused by Brucella ovis. *Appl. Microbiol.* 1973;26:855-857.
- 59.- Nicoletti, P. Diagnóstico de brucelosis. Algunos problemas y nuevos descubrimientos. *Memorias del Foro Nacional sobre Brucelosis*. INIP-ENEP. México. Dic. 1978, p. 67-69.
- 60.- Pan, I.C. Spectrum of ovine immunoglobulins. *Proc. Soc. Expt. Biol. Med.* 1968;129:867-870.
- 61.- Pérez, I.A. Situación actual de la ovinocultura en México. *Memorias del curso de actualización*

- 1979; p. 1-86.
- 62.- Pérez, E.; Flores, C.R.; Higuera, J.A. Diagnóstico y descripción de un brote de epididimitis ovina en México originado por Brucella ovis. Vet. México. 1979;10:221-226.
  - 63.- Plant, J.W. Serological, bacteriological and pathological changes in rams following different routes of exposure to Brucella ovis. Aust. Vet. 1966;63:409-411.
  - 64.- Ponce, L.J. Elaboración de productos biológicos empleados en el diagnóstico y prevención de la brucelosis. Memorias del Foro Nacional sobre Brucelosis. INIP-ENEPE. México, D.F. 1978 p. 70-75.
  - 65.- Renoux, G. Sur l'existence probable de nouveaux antigènes des Brucella, avec un nouveau schéma proposé pour représenter la répartition de antigènes. Ann. Inst. Pasteur. 1955;88:528-532.
  - 66.- Riezu-Boj, J.I. Comparison of lipopolysaccharide an outer membrane protein lipopolysaccharide extracts in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of Brucella ovis infection. J. Clin. Microbiol. 1986;23:938-942.
  - 67.- Rodríguez, H.G. Epizootiología de la brucelosis. Memorias del Foro Nacional sobre Brucelosis. INIP-ENEPE. México, D.F. Dic. 1978; p. 10-39.
  - 68.- Ruiz, C.M. Brucelosis. Ed. Prensa Médica Mexicana. México, D.F. 1954.
  - 69.- SARH. Información Agropecuaria y Forestal 1983. Subsec. Agr. Op. Dir. Gral. Ec. Agríc.
  - 70.- Searson, J. Sensitivity and specificity of two microtitre complement fixation test for the diagnosis of Brucella ovis infection in rams. Aust. Vet. J. 1982;58:5-7.
  - 71.- Shott, L. Autoimmunity in the pathogenesis of infectious ovine epididymitis. Cornell Vet. 1971; 61:281-295.
  - 72.- Simmon, G.C.; Hall, W.T. Epididymitis of rams. Aust. Vet. J. 1953;29:33-40.
  - 73.- Spencer, T.L. Enzyme-linked immunosorbent assay for Brucella ovis specific antibody in ram sera. Res. Vet. Sci. 1984;194-198.
  - 74.- Suárez, G.F.; Martínez, Y.E. Presencia de anticuerpos contra la Brucella ovis en borregos Tabasco o Pelibuey. Resumen de la XI Reunión Anual del INIP. México, D.F. 1974; p. 20.
  - 75.- Suárez, G.F.; Flores, C.R. Brucelosis en diferentes especies animales. Memorias del Foro Nacional sobre Brucelosis. INIP-ENEPE. México, D.F. 1978; p. 40-46.
  - 76.- Suárez, C.C. Immunochemical studies of oligosaccharides obtained from the lipopolysaccharide of Brucella ovis. Vet. Microbiol. 1980;22(4):349-356.
  - 77.- Stoimenov, K.; Gerasimov, G. Outbreak of ovine abortion associated with infections epididymitis. Vet. Sbirka. 1990;88(1):28-29.
  - 78.- Symons, L.E. The application of a complement fixation to the diagnosis of ovine brucellosis. - Aust. Vet. J. 1955;31:29-30.
  - 79.- Szyfres, B. Comprobación bacteriológica de la epididimitis infecciosa ovina en la República Argentina. Rev. Fac. C. Vet. La Plata, Argentina, año III, No 9 IIA Epoca; p. 405-509. 1961.
  - 80.- Tamayo, R. Determination of Brucella ovis antibodies in sheep in Región X, Chile. Archivos Med. Vet. Chile. 1989;88:28-29.
  - 81.- Todd, S.; Henry, J. Diagnóstico Clínico por el laboratorio. 6ª ed. Salvat ed. 1981 Méx. p. 991.
  - 82.- Van Heerden, K.M. Results obtained by the use of Rev. 1 vaccine in sheep against infectious infertility suspected to be caused by ovine brucellosis. Bull. Off. int. Epiz. 1984;62:997-1001.
  - 83.- Webb, R.F. Evaluation of procedures for the diagnosis of Brucella ovis infection in rams. Aust. Vet. J. 1980;56:172-175.
  - 84.- West, D.M. Epiphysitis in rams following vaccination against Brucella ovis infection. New Zeal. Vet. J. 1978;26:133-134.
  - 85.- White, P.G. Differentiation of smooth and nonsmooth colonies of Brucellae. J. Bact. 1951;61:239-240.
  - 86.- Worthington, R.W. A comparison of three serological tests of the diagnosis of Brucella ovis infection in rams. New Zeal. Vet. J. 1984;32:58-60.