

21



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**COMPARACIÓN DE 3 ANTÍGENOS UTILIZADOS PARA
EL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LA BRUCELOSIS
CANINA POR LA PRUEBA DE AGLUTINACIÓN EN
PLACA CON Y SIN 2 β MERCAPTOETANOL**

T E S I S

**PRESENTADA ANTE LA DIVISIÓN
DE ESTUDIOS PROFESIONALES DE LA
FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTÉCNIA DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

P O R :

FERMÍN JIMÉNEZ FLORES

**ASESORES: M.V.Z. PhD. FRANCISCO SUÁREZ GÜEMES
M.V.Z. MsC. JESÚS VÁZQUEZ NAVARRETE**



MÉXICO, D.F.

284408

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**COMPARACIÓN DE 3 ANTÍGENOS UTILIZADOS PARA EL DIAGNÓSTICO
SEROLÓGICO DE LA BRUCELOSIS CANINA POR LA PRUEBA DE
AGLUTINACIÓN EN PLACA CON Y SIN 2 β MERCAPTOETANOL.**

**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
FERMÍN JIMÉNEZ FLORES**

**ASESORES: M.V.Z. Ph.D. FRANCISCO SUÁREZ GÜEMES
M.V.Z. MSc. JESUS VÁZQUEZ NAVARRETE**

MÉXICO, D.F.

2000

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a:

Johana Karina y Fermín Mauricio,
por ser lo máximo para mí.

Teresa Flores Pineda y Pedro Jiménez Olivares,
por su apoyo incondicional, por su gran amor hacia mí, por impulsar mis decisiones.

María de Jesús,
por ayudarme a conocerme mejor y por su amor.

Ale, Rosy, Fabian y Miguel Ángel,
por apoyarme en todos los momentos.

Mis tíos, en especial a Margarita y mis abuelos,
por su apoyo durante toda mi vida.

Toda aquella gente que día con día luchan por el bienestar de la humanidad.

Todos los Profesores que me apoyaron en mi formación y a todos los que se preparan día con día para hacer mejores hombres para México.

Nuestra querida H. Universidad Nacional Autónoma de México.

Nuestra H. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Toda aquella gente que de alguna u otra forma intervino para que este trabajo culminara.

AGRADECIMIENTOS

Al Ph D. Francisco Suárez G., por todo el apoyo brindado a lo largo de mi estancia en este H. Departamento

Al Ms C Jesús Vázquez Navarrete, por sus atinados consejos.

A mi Jurado por sus valiosos comentarios:

Dra. Socorro Lara

Dr. Roberto Cervantes.

Dra. Rosa Elena Miranda.

Dr. Francisco Suárez.

Dra. Marcela Figueroa.

A todo el personal del H. Departamento de Microbiología e Inmunología.

Al personal del Hospital Veterinario de la FMVZ por su apoyo.

Al personal del Departamento de Reproducción e Inseminación de la FMVZ por su apoyo.

Al personal de los albergues caninos de Cuajimalpa, por su apoyo.

A mis amigos que me alentaron en momentos críticos del trabajo: Enrique Corona, Mario Mijangos, Manuel Quiróz, Israel Mendoza, Armando Rodríguez...

CONTENIDO

	Página
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. Generalidades	2
2.2. Diagnóstico bacteriológico	9
2.3. Diagnóstico serológico	10
2.3.1. Inmunodifusión	11
2.3.2. Inmunoensayo enzimático (ELISA) con diferentes antígenos	11
2.3.3. Aglutinación en tubo con 2 β ME	13
2.3.4. Aglutinación rápida en placa (ARP) con y sin 2 β ME	14
2.4. Justificación, hipótesis y objetivos	16
3. MATERIAL Y MÉTODOS	17
3.1. Animales en estudio	17
3.2. Muestras sanguíneas	17
3.3. Medios de cultivo	17
3.4. Estudio bacteriológico	18
3.5. Estudio serológico	18
3.6. Análisis estadístico	19
3.7. Preparación de antígenos	19
4. RESULTADOS	22
4.1. Serología	22
4.2. Sensibilidad	23
4.3. Especificidad	23
4.4. Valor predictivo positivo	24
4.5. Valor predictivo negativo	25
5. DISCUSIÓN	29
6. CONCLUSIONES	35
7. LITERATURA CITADA	36
TABLAS:	
1.- Matriz para el cálculo de sensibilidad, especificidad y valores predictivos	19
2.- Resultados del análisis de varianza de los títulos serológicos convertidos a log 2	22
3.- Porcentaje de correlación entre los resultados de los 3 antígenos con 2 β ME	22
4.- Porcentaje de perros que reaccionaron por títulos	26
5.- Porcentaje y cantidad de aislamientos por sexos	26
6.- Aislamientos por edad y porcentaje de ellos	27
FIGURAS:	
1.- Sensibilidad de cada antígeno por dilución con y sin 2 β ME	23
2.- Especificidad de cada antígeno por dilución con y sin 2 β ME	24
3.- Valor predictivo (+) de cada antígeno por dilución con y sin 2 β ME	24
4.- Valor predictivo (-) de cada antígeno por dilución con y sin 2 β ME	25
5.- Promedio de los títulos en log 2 por grupos de edad	25
6.- Promedios en log 2 por antígeno y tratamiento con y sin 2 β ME	27

1.- RESUMEN:

JIMENEZ FLORES FERMÍN. Comparación de 3 antígenos utilizados para el diagnóstico serológico de la brucelosis canina por la prueba de aglutinación en placa con y sin 2 β -Mercaptoetanol". (bajo la Asesoría de Francisco Suárez Güemes y Jesús Vázquez Navarrete).

Con el fin de determinar diferencias serológicas se utilizaron 3 antígenos los cuales fueron clasificados como A, B y C elaborados con cepas y metodologías diferentes. Los antígenos fueron evaluados por medio de una prueba de aglutinación en placa utilizada para el diagnóstico serológico de la brucelosis canina causada por *Brucella canis*. Se obtuvieron muestras de sangre con anticoagulante y suero a partir de 182 perros. El muestreo se efectuó al azar y los animales provinieron de varias partes del sur de la Ciudad de México, se consideraron variables como: raza, edad, sexo y tratamiento previo. Se realizaron hemocultivos en todas las muestras. Los aislamientos sugestivos a *Brucella canis* fueron identificados mediante las siguientes pruebas: tinción de Gram para observar morfología, tinción de Ziehl Neelsen modificada para *Brucella* para determinar afinidad tintorial, producción de ureasa, producción de H₂S, triple azúcar hierro y movilidad por medio de una preparación húmeda. Los tres antígenos fueron elaborados siguiendo metodologías diferentes. Las pruebas de aglutinación se realizaron para cada suero probándolo con cada antígeno con y sin 2 β Mercaptoetanol (2 β ME). A los sueros que aglutinaron en una prueba directa (50 μ l de suero y 50 μ l de antígeno) se les realizaron diluciones, iniciando en 1:25 hasta 1:800 para determinar títulos de anticuerpos. Las condiciones evaluadas para cada antígeno fueron: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VP+) y valor predictivo negativo (VP-), con y sin 2 β ME. En este estudio se consideró la dilución 1:200 como punto de partida para considerar bacteremia. La sensibilidad fue disminuyendo conforme aumentaron las diluciones tanto con 2 β ME como sin 2 β ME. El antígeno C fue el que mostró mayor sensibilidad en la dilución 1:200 y 1:400 con respecto a los antígenos A y B que mostraron un comportamiento similar entre ellos a las mismas diluciones. La especificidad aumentó en general conforme aumentaron las diluciones siendo el antígeno C el que mostró menor especificidad comparado con los antígenos A y B que mostraron un comportamiento similar entre ellos. La especificidad fue mayor cuando los sueros se trataron con 2 β ME. El VP (+) fue incrementándose desde la dilución 1:25 hasta la dilución 1:100 y en las 2 siguientes diluciones hubo un descenso del mismo. En general, el VP (+) con 2 β ME fue mayor que sin 2 β ME, siendo el antígeno C menor que los antígenos A y B. El VP- se comportó de manera similar con 2 β ME entre diluciones y antígenos, siendo mayor el antígeno C en las diluciones más altas con respecto al antígeno A y B. Sin 2 β ME el VP (-) disminuyó en las diluciones 1:200 y 1:400 siendo el antígeno C el que menos disminuyó con relación a los otros 2 antígenos.

2.- INTRODUCCIÓN.

2.1-Generalidades La atención de las mascotas ha ido en aumento durante los últimos años, los perros cumplen varias funciones para con el ser humano, entre ellas y de vital importancia en apoyo a minusválidos, guardia y protección, detección de drogas y estupefacientes, compañía, rescate y otras de no menor importancia como cacería, carreras y exposiciones. La industria que gira alrededor de los perros se ha diversificado y aumentado sus ventas anuales, así como ha generado múltiples fuentes de trabajo por citar algunos: fabricación de alimentos, collares, vacunas, escuelas de adiestramiento, medicamentos de todo tipo, fabricación de jaulas y casas. La salud de las mascotas es de importancia tanto para que cumpla su función zootécnica como para evitar la transmisión de enfermedades al hombre. El diagnóstico oportuno y veraz de las enfermedades es de suma importancia para establecer un tratamiento adecuado y la pronta recuperación; en algunos casos como en la brucelosis canina causada por *Brucella canis*, el diagnóstico veraz evita el contagio y diseminación ya que es una enfermedad que usualmente termina con la vida reproductiva de un ejemplar que en ciertos casos es valioso por las características heredables que lleva en su genoma, aunado a su importancia como zoonosis. Los métodos diagnósticos deben ser por lo tanto evaluados metódicamente para que los resultados que de ellos se obtengan sean confiables y rápidos (1).

El género *Brucella* se clasifica en el subgrupo α 2 de la clase Proteobacteria, se comporta como patógeno intracelular facultativo (2). Este comportamiento guarda una relación con la estructura y fisiología de la bacteria, cuyos componentes, inducen una respuesta inmune con efectores de tipo humoral y celular (2).

Brucella canis es un cocobacilo pequeño de 0.5 μ de ancho por 0.5 a 2 μ de largo, generalmente se observan solas, en cadenas cortas o en grupos pequeños. En el aislamiento primario tienen forma cocoide y después de varios pases en medios artificiales de cultivo tienden a formas más bacilares (3,4).

Son microorganismos inmóviles y retienen la tinción de Gram en un mayor grado que las enterobacterias Gram negativas, siendo esta una característica del género *Brucella*. Con las tinciones convencionales para cápsula no se puede demostrar su presencia. Al utilizar el procedimiento mencionado por Huddleson (1941)

se observa un halo delgado alrededor de la bacteria como cierto material capsular (3) sin embargo, se considera no capsulada.

Es una bacteria aerobia y un 10% de CO₂ inhibe su crecimiento. En agar triptosa a 37 C las colonias se hacen aparentes a las 48 horas de incubación y después de 3 a 4 días de incubación alcanzan un diámetro que va de 0.3 a 2 mm. Las colonias son blanco grisáceas, parcialmente translúcidas. El crecimiento se hace mucoso dentro de la primer semana de incubación lo que hace difícil el poder retirar la colonia de la superficie de agar. No produce hemólisis en agar sangre ni en caldo sangre (3,5)

Bioquímicamente tiene similitud con *Brucella suis* (3,5). Es una bacteria que produce la enzima catalasa, es indol negativo y produce H₂S después de varios días de incubación (3). Sin embargo Moore (6) menciona que no produce H₂S. No fermenta los carbohidratos. En leche tornasolada sólo produce alcalinidad después de 7 días de incubación. Es oxidasa negativo cuando se impregna el papel filtro con el reactivo de diclorhidrato de tetrametil p-fenil-diamina a concentración normal, Moore (7) menciona que es oxidasa positivo. Es citrato negativo pero hidroliza rápidamente la urea y reduce los nitratos a nitritos. No licúa la gelatina, la prueba de acetoina es negativa y no crece en agar MacConkey (3,6). Algunas cepas utilizan más eficientemente el eritritol que otras (8).

No es lisada por el fago TB, Fi, S708 Wb y BK2. Sólo el fago R/C en dosis de prueba de rutina (RTD) y RTD 10⁴ si lisan a *Brucella canis* (8).

Brucella canis poseé en común con las otras especies del género numerosos antígenos citoplasmáticos los cuales pueden demostrarse fácilmente mediante estudios de inmunodifusión en gel, con antígenos solubles extraídos por sonicado. sin embargo, la naturaleza rugosa confiere a la pared celular de *Brucella canis* propiedades antigénicas diferentes a las cepas lisas de *Brucella*, de esta forma las pruebas diagnósticas serológicas para otras brucelas no deben usarse para el diagnóstico de infecciones causadas por *Brucella canis*. Se han observado reacciones cruzadas con cepas rugosas de *Brucella* como por ejemplo *Brucella ovis* y *Brucella abortus* cepa 45/20, y también con otras bacterias Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Bordetella bronchiseptica* y *Staphylococcus aureus* (3). La precipitación ácida de antígenos de superficie de la pared celular extraídos con deoxicolato de sodio sugiere que estos complejos antigénicos pueden ser

responsables de la agregación bacteriana en medios de cultivo líquidos con pH ácido y de la alta viscosidad colonial en medios de cultivo con agar a pH de 6.8 (9).

El hecho de que los antígenos rugosos (R) de *Brucella canis* pueden compartir determinantes antigénicos con otras bacterias (también presentes en forma rugosa) y ocasionar reacciones inespecíficas acarrea dificultades en la interpretación de los resultados en varias pruebas serológicas. Por cromatografía de gases se ha demostrado que comparte ácidos grasos celulares con otras especies de *Brucella* (10).

La bacteria aglutina con antiseros antibrucela R pero no con antiseros anti A o anti M (8). En lo que se refiere a las proteínas de membrana externa llamadas porinas, por medio de la prueba de electroforesis se observan líneas con peso molecular similares entre *Brucella abortus* (rugosa), *Brucella ovis* y *Brucella canis* (11). Con respecto a las proteínas citoplasmáticas es necesario mencionar que los perros positivos a la enfermedad tienen anticuerpos contra ellas no así los perros negativos demostrado por electroforesis y por Western Blott. Durante el primer mes de infección las proteínas intracitoplasmáticas de 18, 22, 31, 42 y 54 kDa fueron reconocidas por los sueros de los perros positivos. La proteína de 20 kDa fue reconocida a la 8-10 semanas pos infección pero después de 6 meses su detección fue inconsistente. Otros polipéptidos detectados de los 2 a los 12 meses pos infección fueron de 22, 66-68 y menos regularmente de 42, 60, 82, 100 y mayores de 200 kDa. Los polipéptidos más consistentemente reconocidos, por los sueros de perros positivos fueron los de 18, 22 y 68 kDa (12).

Las manifestaciones clínicas son variables, por lo que el diagnóstico clínico no es confiable. Se ha reportado pérdida del vigor y baja tolerancia al ejercicio y se caracteriza principalmente en hembras por abortos y falla de la concepción; en machos se presenta orquitis uni o bilateral con degeneración testicular después de 30 a 35 semanas postinfección, hay una epididimitis principalmente con inflamación de la cola del epidídimo, dermatitis escrotal e infertilidad. En ambos sexos se observa un aumento de tamaño de los nódulos linfáticos uni o bilateral. La enfermedad se presenta en criaderos, en perros de la calle y en mascotas. No presentan signología de fiebre a pesar de haber bacteremia (3,4,5,6,7,8,13,14).

Una perra infectada puede abortar 2 a 3 veces seguidas o no abortar y dar cachorros débiles o muertos en una misma camada, la infección no interfiere con el ciclo estral de la perra, algunas veces el único signo es que se llega la fecha de parto y éste no ocurre ya que abortó poco antes y se comió a la camada (13). No existe

diferencia en la susceptibilidad relacionada con la edad pues se han observado abortos en hembras desde 1 hasta 10 años con el mismo cuadro, aunque se observan más abortos en perras de 2 a 4 años debido a la distribución normal de esta edad en los criaderos (4).

El exudado vaginal posterior al aborto tiene un olor desagradable y el color es amarillo hasta café-grisáceo, es viscoso y pegajoso, y se presenta desde 1 hasta 6 semanas posterior al aborto. la cantidad de bacteria por ml de secreción puede ser de 10^8 UFC (unidades formadoras de colonia) por ml y no se observa retención placentaria (4,13).

Los perros son la única especie animal en la que la enfermedad se presenta de manera natural (6,7,15), sin embargo existen reportes de infecciones experimentales o accidentales en conejos, primates no humanos, gatos, coyotes, algunas especies de zorras, mapaches, zorrillos y tejones (16,17,18,19).

Los cerdos, ovejas y ganado son resistentes a la infección por *Brucella canis*. La signología en otros animales es variable, por ejemplo de 14 gatos inoculados por vía oral sólo 3 fueron bacterémicos y ninguna de las 4 gatas gestantes inoculadas abortaron y al parto sus gatitos nacieron sin signos ni bacteremia (20).

La bacteria se transmite en el momento del aborto a través de las descargas vaginales que contienen de 10^8 hasta 10^{10} UFC por mililitro y en la fase de celo por secreciones vaginales por el hábito de los perros de lamerse. si consideramos que la dosis infectante por vía oral para un perro es de 2×10^6 UFC, éste se puede infectar fácilmente (21). Otra forma de infección es durante la cópula (5,13,21). La forma conjuntival también es una vía de contagio pero poco frecuente (6). Al permanecer la bacteria en el tracto reproductor ésta se puede eliminar por arrastre de la orina la cual es potencialmente infectante para otros perros (13,21,22,23). La leche es otra vía de transmisión de la madre a los cachorros que pudieran no haberse infectado *in utero* (21). La infección a través de fomites es posible inmediatamente después de la contaminación de este ya que hay baja sobrevivencia de la bacteria en el medio ambiente. Por toda esta amplia gama de formas de transmisión es necesario implementar programas preventivos y de monitoreo en los perros.

La lesión principal en los nódulos linfáticos es hiperplasia de células linfoides y reticulares en forma difusa así como esplenomegalia y en casos crónicos discocostondilitis (4,13). También puede presentarse meningoencefalitis, engrosamiento hialino en la membrana basal así como una ligera nefritis intersticial,

iridociclitis y retinitis exudativa (4). Puede haber necrosis focal hepática y miocarditis. En machos hay inflamación de la cola del epidídimo, donde se realiza la maduración testicular, con la consecuente infertilidad debido a una reacción autoinmune hacia los espermatozoides, finalmente se desarrolla una atrofia testicular uni o bilateral con grado variable. La inflamación escrotal generalmente es causada por la acumulación de fluidos dentro de las tunicas lo que ocasiona dolor y la dermatitis es debida a las constantes lamidas del perro e infecciones bacterianas secundarias. En las hembras gestantes no hay lesiones adicionales a menos que hayan recientemente abortado y los cambios en el útero corresponden a la etapa de gestación pero es común observar una endometritis con hiperplasia glandular y nódulos con células reticulares (4). Los fetos abortados están parcialmente autolizados con edema subcutáneo y hemorragias subcutáneas en la parte abdominal, esta apariencia sugiere muerte fetal intrauterina antes de ser abortados, no se observan fetos en descomposición porque generalmente la madre se los come (4).

Se debe sospechar de la enfermedad cuando haya un aborto espontáneo y más si este ocurre en el último tercio de gestación, cuando haya repeticiones de celo después de una monta exitosa, cuando haya cambios físicos en el epidídimo, orquitis uni o bilateral, poliartrosis, discoespondilitis y piogranulomas en piel (4,7,24,25,26). También es necesario considerar a esta enfermedad cuando haya fallas reproductivas, cachorros débiles o muertos y cuando haya muerte de cachorros en la primer semana de nacidos. Ninguno de los signos anteriores son patognomónicos de la enfermedad ya que se ha demostrado que hay otros agentes etiológicos como *Streptococcus spp.* β hemolíticos, *Escherichia coli*, Herpesvirus de los perros y desordenes endócrinos que ocasionan también los signos anteriores (7).

Desde la descripción de la enfermedad en la década de 1960 a 1970 varios autores han considerado la quimioterapia como una alternativa a la eutanasia de animales infectados. El éxito del tratamiento es variado, en términos generales los investigadores coinciden que no hay cura definitiva. Otra medida necesaria es la castración de los machos para evitar que sigan diseminando a la bacteria e infecten animales susceptibles (27,28). La falla de un tratamiento se le atribuye a la fase intracelular en el sistema reticuloendotelial de la bacteria y la poca capacidad de la mayoría de los antibióticos para atravesar la membrana celular (28). Existen varios criterios para considerar exitoso un tratamiento, sin embargo, el más confiable es el de Flores Castro y Carmichael (28) en el que después de 6 a 28 semanas del tratamiento no se aislaron bacterias de sangre y

varios órganos y por supuesto los títulos eran negativos con varias pruebas; esto da cierta seguridad que la bacteria ha sido erradicada (28). El mejor régimen citado es el siguiente: 10 mg/kg de hidrocloreto de monociclina durante 14 días y 4.5 mg/kg de estreptomocina 2 veces al día durante 7 días, con esto 15 de 18 perros se curaron (83%). Al aplicar únicamente minociclina, tetraciclina más sulfonamidas o rifampicina todos ellos individualmente no fueron capaces de eliminar a la bacteria del perro (28).

Zoha y Walsh citados por Nicoletti 1987 (29) utilizaron inyecciones de oxitetraciclina a 20 mg/kg cada semana por 4 semanas y 15 mg/kg de estreptomocina dividido en 2 administraciones para el periodo inicial de siete días y para los últimos 7 días. Ellos evaluaron cada dos meses el comportamiento serológico y bacteriológico considerando negativo si eran negativos al aislamiento, con un título máximo de 1:50 por AT y negativo por ID, seis meses después 19 de 24 perros (79%) fueron serológica y bacteriológicamente negativos (28).

Los abortos se reducen con la antibioterapia sin embargo, el que haya hemocultivos negativos, títulos negativos o ausencia de abortos no son evidencia de cura. Los tratamientos tempranos son más exitosos por lo que la quimioterapia puede inhibir el desarrollo de la brucelosis en perros recientemente expuestos a *Brucella canis* (28). Las tetraciclinas *in vitro* tienen la concentración mínima inhibitoria (MIC) más baja con 0.06-0.50 mg/lt, los macrólidos no inhiben a la bacteria, se observa sinergia entre enrofloxacina y aminoglucósidos y doxiciclina con estreptomocina; la estreptomocina es el antibiótico que más rápido inhibe *in vitro* a *Brucella canis* (27).

La infección experimental en primates (*Macaca arctoides*) indica un posible comportamiento de la enfermedad en el humano, en el caso de los primates infectados experimentalmente muestran que desde la segunda semana posinfección (PI) ya es posible aislar a la bacteria de sangre y a las 5 semanas se pudo aislar la bacteria de varios órganos como hígado, riñón y útero (17). En las primeras 2 semanas PI no se detectaron anticuerpos y en la 3er semana ya se tenían títulos de 1:160 por AT y para la semana 5 los títulos estaban en 1:1280 para todos los animales en la prueba. Las lesiones en órganos son similares a aquellas formadas por otras brucelas (17).

Brucella canis en humanos no se diagnostica por la falta de antígenos disponibles y por no considerarse como posibilidad diagnóstica, sin embargo Polt *et al* (30) y Vázquez en México han reportado pacientes infectados

por *Brucella canis* que presentan cuadro clínico (31). Las pruebas contra otras brucelas no son de utilidad para el diagnóstico por diferencias antigénicas. Los síntomas son muy variados por lo tanto la antibioterapia es inmediata lo que dificulta el aislamiento y el diagnóstico. La prueba de aglutinación en placa con 2 β ME puede ser de utilidad para la detección de la enfermedad en humanos (31) Una consideración importante es la detección de una respuesta inmune independientemente de la presencia de la bacteremia (30).

En trabajos realizados en México se han encontrado más de 3000 pacientes seropositivos con títulos que varían de 1:50 a 1:400, comparativamente en un estudio realizado en Florida de 303 personas sólo en 3 sueros se demostraron anticuerpos (32).

La bacteria se transmite de un perro portador de manera directa o indirecta por materiales contaminados al humano. Los síntomas más comunes son fiebre recurrente, dolor de cabeza, resfriados, dolor abdominal, pérdida de peso, esplenomegalia, linfadenitis cervical, axilar y epitroclear (15,33). En pacientes crónicos son comunes problemas cervicales y articulares (31). El conteo leucocitario está dentro de los márgenes normales, la función hepática es generalmente normal o ligeramente elevada (30).

En un estudio serológico utilizando una microaglutinación se encontró que las mujeres tuvieron títulos más altos que los hombres y la explicación es que ellas se convierten más que los hombres al infectarse con bacterias eliminadas principalmente por orina ya que ellas son las que por lo general realizan la limpieza de la casa. Se encontró también que es una enfermedad principalmente ocupacional ya que los Veterinarios tuvieron títulos más altos que otros sectores de la población (34).

Si bien, actualmente se trabaja intensamente en las pruebas moleculares, para el diagnóstico de la Brucelosis canina aún no está disponible una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en México como prueba de rutina. Esta prueba tiene ventajas por las características moleculares y químicas de *Brucella spp.* proveen de información determinante tanto para diagnóstico de la enfermedad a partir de muestras clínicas como para diferenciar organismos muy relacionados que difícilmente se puede hacer por otros métodos. Normalmente la identificación bacteriana o detección de portadores se realiza primariamente por serología y características fenotípicas de la bacteria teniendo sus desventajas, ejemplo de ello es que existen cepas rugosas de las diferentes especies de *Brucella* u otras bacterias que comparten epítopes y su diferenciación se dificulta aún con anticuerpos monoclonales (35). La reacción en cadena de la polimerasa por la amplificación

del interspacio del RNA ribosomal 16S-23S permite identificar completamente al género *Brucella* de otras bacterias como *Bartonella spp* y *Agrobacterium spp* que están muy relacionadas siendo de la clase Proteobacteria. Un PCR es de utilidad para la detección de portadores de *Brucella canis*. En el caso de *Brucella canis* se diferencia de otras brucelas ya que no tiene el raro amino azucar quinovosamina en su LPS contrario a *Brucella abortus*, *B.mellitensis* y *B.suis* (35).

2.2- Diagnóstico bacteriológico.

El aislamiento bacteriano mediante hemocultivo es la prueba contundente para diagnosticar la enfermedad (36), sin embargo tiene varias ventajas, una de ellas es que la bacteremia no es constante y la duración es variable. es necesario en algunos casos hacer hemocultivos repetidos y aún así nos encontramos con casos falsos negativos. El resultado del hemocultivo se lleva un mínimo de 72 horas y un máximo 9 días y para realizarlo se requieren condiciones de seguridad, equipo, medios de cultivo adecuados y personal capacitado para ello. Los hemocultivos siguen una técnica ya descrita (37). De esta forma es necesaria la combinación de este recurso con el diagnóstico serológico (1,29). Ahora bien, el aislamiento no es común en animales con títulos menores a 1:200 por la prueba de AT (Aglutinación en tubo) ni ARP (Aglutinación rápida en placa) con 2 β ME (14,38,39,40,29).

El microorganismo se aísla principalmente de sangre, leche, descargas vaginales, de placenta y útero; en fetos principalmente de líquido estomacal, hígado y pulmón. Aunque el porcentaje de aislamientos a partir de semen es bajo, especialmente después de la sexta semana posinfección, se ha demostrado que es una vía de diseminación hasta por 60 semanas posterior a la infección. El aislamiento a partir de la próstata y epididimo es común hasta por 2 meses después de haber cesado la bacteremia (5,8,21). Es importante mencionar que de los animales que tienen un título de 1:200 por ARP 2 β ME o AT 2 β ME en un 50 a 86% de ellos es posible que se aisle la bacteria (29,41).

La orina es otra muestra de la cual se puede aislar la bacteria aunque no es muy común. La orina es otro vehículo de infección al contaminarse por secreciones prostáticas, seminales y testiculares, la orina puede contener hasta 10⁶ UFC por ml (21,22,23).

2.3- Diagnóstico serológico.

Hoy en día no hay una Norma Oficial que favorezca el control de esta enfermedad por lo que no hay un control organizado y sistematizado excepto en ciertos criaderos. Actualmente no es una enfermedad de reporte obligatorio. Con estas particularidades la enfermedad prevalece libremente.

El serodiagnóstico de la enfermedad posee un dilema particular porque varias pruebas usadas por los laboratorios de diagnóstico no han sido evaluadas críticamente y pueden dar resultados falsos positivos (1). Existen una serie de estudios de tipo seroepidemiológico que han evaluado la respuesta inmunológica de diferentes especies animales, especialmente perros, a la bacteria y han estudiado el comportamiento de la enfermedad, todos ellos utilizando diferentes pruebas con resultados variables (16,18,19,42,38,43,39, 44,45,46,47,48,32,48,50,51,52,53,54,55,56,57,40,58,59).

Para la preparación de antígenos y el desarrollo de pruebas diagnósticas específicas para *Brucella canis* a diferencia de *Brucella ovis*, el crecimiento de los aislamientos de campo de *Brucella canis* es mucosoide (M+) siendo ésta una propiedad que afecta adversamente la estabilidad (1,60). Existen varias pruebas serodiagnósticas ya que son los métodos más comúnmente usados para evaluar el estado del perro antes de la reproducción, pero ninguno es ideal por lo que se sugiere la combinación de varias de ellas ya que el valor predictivo positivo de estas pruebas varía de 40 a 80% (1). La adición del 2 β ME en las pruebas de aglutinación ha reducido en un 10% las reacciones falsas positivas pero no están totalmente eliminadas. Las reacciones negativas son altamente seguras (> 95% de intervalo de confianza) y dan la seguridad de que por lo menos el perro no ha sido infectado dentro de las 3 a 4 semanas previo al muestreo. los resultados de las pruebas de aglutinación en placa correlacionan bien con las de aglutinación en tubo, así que se puede usar a la primera como monitoreo rápido (1). La sangre de todo perro sospechoso o positivo debe ser cultivada y de ser posible realizar una prueba de inmunoensayo enzimático con proteínas citoplasmáticas para rendir un diagnóstico definitivo y evitar eliminar perros falsos positivos (1).

Se recomienda el estudio serológico en los siguientes casos: historia de aborto, epididimitis e infertilidad, previo al ingreso de un nuevo perro a un criadero, constatación de salud premona, para remover perros positivos de un criadero en etapa de erradicación (5) y perros que se van a movilizar (50). Para la realización de estas pruebas es importante evitar la hemólisis para disminuir las reacciones falsas positivas en las pruebas

de aglutinación, se necesita como mínimo 0.5 ml de suero. Después de la infección los perros desarrollan bacteremia desde la primer semana a la tercer semana, paralelamente hay un incremento de anticuerpos disminuyendo éstos en períodos no bacterémicos (4,6).

Aunque se han probado la contraelectroforesis y fijación de complemento (52), las más comunes son aglutinación en tubo, aglutinación en placa, inmunodifusión e inmunoensayo enzimático. Recientemente se han desarrollado pruebas como la reacción en cadena de la polimerasa, sin embargo, para el diagnóstico de *Brucella canis* en México aún no está disponible. Todas las pruebas serológicas usadas comercialmente hasta la fecha para la detección de anticuerpos contra *Brucella canis* tienen una alta sensibilidad lo cual ocasiona un margen de error (36,62,63) ya que los determinantes antigénicos superficiales de algunas bacterias como: *Actinobacillus equuli*, *Bordetella bronchiseptica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella*, entre otras, aglutinan al contacto con anticuerpos contra *Brucella canis* (36,63).

2.3.1- Inmunodifusión .

La inmunodifusión (ID) tiene baja sensibilidad y especificidad comparada con las pruebas cualitativas de ARP y cuantitativas de la AT ya que sueros positivos o sospechosos por la ARP o AT son negativos por la ID (64). La inmunodifusión que utiliza antígenos citoplasmáticos son sensibles entre la tercera y octava semana después de presentarse la bacteremia y tiene la ventaja de detectar animales infectados por mas de 12 meses después de que la bacteremia ha cesado, tiempo en que otras pruebas serológicas dan resultados equivocados, la principal desventaja es su complejidad de elaboración y dificultad de la lectura después de 72 horas de incubación (1,61,62,65). La prueba de ID no discrimina entre una infección activa y una infección crónica (65). La inmunodifusión y la ELISA con proteínas citoplasmáticas se recomiendan para confirmar el diagnóstico por ARP 2β ME o AT 2β ME que han dado resultados positivos (1). La ID se puede realizar con proteínas intracitoplasmáticas, proteínas de membrana externa o lipopolisacárido (1).

2.3.2- Inmuno ensayo enzimático (ELISA) con diferentes antígenos.

Se han desarrollado varias pruebas inmunoenzimáticas (66,67,68) que pueden ser utilizadas para el diagnóstico de la enfermedad.

Estas pruebas son de importancia por su alta sensibilidad, especificidad y rapidez de realización y con la ventajas de que no se observa autoaglutinación como sucede con antígenos preparados para pruebas de aglutinación a partir de cepas de campo, no se afecta con muestras que presentan efecto anticomplementario ni por muestras hemolizadas con capacidad autoaglutinante. Sin embargo en todas ellas se requiere de personal capacitado y equipo específico.

Utilizando una ELISA con antígeno completo se observa una diferencia significativa de hasta 10 veces entre las absorbancias de los animales inoculados y los negativos por lo que permite diferenciar perfectamente los positivos de los negativos (66).

Una ventaja importante de la prueba de inmunoensayo enzimático con respecto las pruebas de inmunodifusión es que, en ésta última a veces se forman líneas inespecíficas que confunden y dificultan el diagnóstico. Aunque el uso de antígenos citoplasmáticos en inmunodifusión parecen ser de valor ya que las reacciones inespecíficas disminuyen radicalmente (67).

En una prueba de ELISA (67) que utiliza un extracto salino caliente (ESC) se demostró una sensibilidad de 93.8% y una especificidad de 95.6%. Se menciona que hay diferencia entre los antígenos de una cepa de campo (2R y 3R) y la variante M- (2S, 3AS y 2BS) (63,67) lo que se demuestra en las absorbancias siendo más altas para los extractos de la cepa de campo RM6-66 que para los extractos de la cepa M-, lo anterior se obtuvo utilizando sueros negativos donde no debería haber tal diferencia, además la cepa M- es más hidrofílica (67). Los antígenos de *Brucella canis* M+ extraídos por el método de solución salina bufferada caliente son de menor tamaño, tienen una carga neta negativa más baja y son más hidrofóbicos que los antígenos de *Brucella canis* M- extraídos por el mismo método (63). Si bien el antígeno 2S de la M- y el 2R de la cepa de campo son indistinguibles por ID, difieren en sus propiedades hidrofóbicas (carga neta diferente) debido a diferencias físicas en la polimerización de los complejos (63).

El antígeno 2R es específico de la pared celular de *Brucella canis* (36). El antígeno 3R es común para las brucelas rugosas y es responsable de las reacciones cruzadas no específicas en las pruebas de ID con antígeno ESC (36,67). El antígeno 3R de la cepa RM6-66 comparte sólo homología parcial con el antígeno 3AS y 3BS de la cepa M-, lo que sugiere que la cepa M- tiene un componente que probablemente cubre las regiones hidrofóbicas (63,67). El buen desempeño de la prueba puede ser debido a que el antígeno 2S específico de *Brucella canis* es indistinguible del 2R y la otra, es que los antígenos 3AS y 3BS de la M- tienen homología

parcial con el antígeno 3R el cual es el responsable de las reacciones falsas positivas (67). La prueba clasificó correctamente al 93.75% de los sueros positivos y el 95.65% de los sueros negativos, el 92.85% de los falsos positivos fueron clasificados como negativos (67).

En otra prueba de ELISA se utilizó un antígeno de pared celular purificado con columnas inmunoabsorbentes conteniendo 2 proteínas de 30 y 28 kilodaltons y un polisacárido de 12 kilodaltons. Los perros inoculados fueron positivos a la prueba de ELISA y animales SPF fueron negativos: los perros que fueron negativos por AT también fueron negativos por ELISA, de 78 perros que fueron sospechosos por AT. 20 fueron positivos por ELISA, inmunodifusión y hemocultivo; sólo un perro positivo a ELISA e inmunodifusión fue negativo al aislamiento; esto indica que la prueba de ELISA es una prueba serológica específica para la detección de la brucelosis canina (68). Finalmente es necesario realizar más pruebas para estandarizar la prueba de ELISA con antígeno purificado citoplasmático (1).

2.3.3- Aglutinación en tubo con 2 β ME.

Si bien esta prueba fue la más utilizada en años pasados como confirmatoria de la ARP no es una prueba ideal por varias razones: el antígeno de *Brucella canis* tiende a autoaglutinar bajo ciertas condiciones de pH y concentración de sales, la prueba necesita de 50-52 C o en algunos casos a 37 C para realizarse y requiere de 48 horas de incubación para conocer el resultado. La aglutinación en algunos casos es incompleta (5,41). Se requiere de sueros no hemolizados debido a que el antígeno puede co-precipitar con la hemoglobina desnaturalizada con calor (5). Una desventaja de esta prueba es que no es capaz de detectar bajos niveles de anticuerpos en perros infectados crónicos abacterémicos en las primeras semanas posinfección, no detecta perros bacterémicos que producen bajos niveles de anticuerpos, existe la desventaja del fenómeno de prozona (41). Los resultados en AT correlacionan con los resultados obtenidos de los mismos sueros con la prueba de ARP (14,41) en un 96% con una pequeña diferencia en sensibilidad con la AT 2 β ME siendo esta no significativa (61). En conclusión el procedimiento de preparación tiene desventajas técnicas que impiden su uso generalizado y los resultados se obtienen después de 48 horas (41). En esta prueba un título de 1:200 es indicativo de una bacteremia (1).

2.3.4- Aglutinación rápida en placa (ARP) con y sin 2β ME.

La prueba se realiza de manera simple, rápida, sin dificultad para interpretarse y útil para detectar la infección (69). Un punto importante en la brucelosis canina es que los perros infectados con *Brucella canis* permanecen infectados por períodos desde un año hasta más de 5 años, virtualmente las pruebas serológicas varían en sensibilidad durante los primeros 2 meses de la enfermedad, después de este tiempo todas las pruebas detectan anticuerpos (29,61). Actualmente se utiliza el antígeno de *Brucella canis* M- debido a que tiene un menor grado de error (10%) que el antígeno a base de *Brucella ovis* y cuando se usa ésta en perros con reacciones dudosas hasta en un 50% (61); No hay diferencia entre ambos antígenos cuando se usa esta prueba en perros realmente positivos y negativos (61). Es necesario mencionar que la prueba ARP fue desarrollada para obtener resultados inmediatos y dar un diagnóstico presuntivo inmediato (29). Algunas características importantes de la cepa variante M- de *Brucella canis* es que, aparentemente es menos virulenta que la cepa M+ y los antígenos extraídos por deoxicolato de sodio no reaccionaron con antiseros contra *Brucella ovis* (60).

Se recomienda que el antígeno tenga una concentración celular del 6%, de esta manera cuando es positivo a 0.01 o 0.005 ml de suero hay una correlación con la prueba de AT con título de 1:200 (69).

La autoaglutinación se elimina cuando se usa una alta molaridad con ácido tris-maleico de 0.2 Molar y teñido con una solución stock al 1% de rosa de Bengala y pH de 7.0 (70) debido a que su sensibilidad es un poco mayor que la ARP con antígeno teñido con cristal violeta (69), por lo que se recomienda como prueba de monitoreo para la detección de la enfermedad agregando que la reacción de aglutinación es más evidente con el antígeno teñido con rosa de bengala (70). La ARP es muy segura para detectar perros no infectados debido a que los resultados falsos negativos son bajos (< al 4%), esta prueba se utiliza para la detección de estados tempranos de la infección por *Brucella canis* (41). Las reacciones no específicas en el suero de perros sanos disminuyen tratando el suero con 2β ME (41). Aún con el tratamiento del suero con 2β ME puede haber falsos positivos (29). La ARP detecta anticuerpos a las 2 semanas postinfección en un 30% de perros y con 2β ME la detección de perros a las 3 semanas es similar a la AT 2β ME (41). El comportamiento en la primera semana es similar a la AT 2β ME. Si el suero es positivo con la ARP y negativo con la ARP 2β ME posiblemente el animal esté en una fase temprana de la enfermedad o tenga aglutininas inespecíficas, para

corroborar el diagnóstico es necesario realizarle después de 30 días una segunda prueba, si continua positivo con la ARP 2 β ME se debe diagnosticar como brucelosis activa (41).

En términos generales cuando un perro es positivo con 0.001 ml de suero por la prueba de ARP también es positivo por otras pruebas (64). Ejemplo de ello es la alta correlación existente entre ARP 2 β ME y AT 2 β ME a dilución de 1:50 para esta última con un 0.75 de similitud (valor Kappa): de ARP 2 β ME utilizando antígeno de *Brucella ovis* y el otro de *Brucella canis* M- con 0.97 (valor Kappa) y finalmente una correlación de 0.74 (valor Kappa) entre ARP-2 β ME e inmunodifusión utilizando antígenos citoplasmáticos purificados (65).

Actualmente, varios antígenos para aglutinación en placa se realizan con la cepa variante de *Brucella canis* (M-) por varias razones: es menos hidrofóbica que la (M+), tiene una carga negativa neta más alta y es menos virulenta que la cepa de campo. Con el antígeno (M-) y tratando el suero con 2 β mercaptoetanol al 0.2 M se aumenta la especificidad sin reducir la sensibilidad (61), pero esto no elimina las reacciones falsas positivas del todo (36). Esta prueba detecta también anticuerpos a partir de la segunda semana posinoculación utilizando como mínimo 0.08 ml de suero en un 40% de los animales y a la tercera semana en un 100% de los perros con 0.04 ml de suero, posterior a la cuarta semana se detecta una fuerte aglutinación en el 100% de los perros hasta con 0.005 ml o un poco menos de suero (61).

Comparando un antígeno elaborado a base de *Brucella canis* (M-) y el de *Brucella ovis* el primero es ligeramente más sensible que el segundo aunque la diferencia no es significativa (61). La ventaja del antígeno (M-) es su baja reactividad con sueros con aglutininas inespecíficas que disminuyen desde un 12% por sí mismo y hasta un 50% cuando los sueros son tratados previamente con 2 β ME, sin embargo no se eliminan por completo los falsos positivos, la sensibilidad se incrementa ligeramente utilizando la cepa (M-) (1,61).

En la prueba de ARP el sacrificar sensibilidad por más especificidad no quiere decir que animales que son negativos por la ARP vayan a dar resultados positivos por otras pruebas con sensibilidad mayor (64).

Entre la ARP e ID (con extractos citoplasmáticos), si los sueros son negativos por ARP comúnmente también son negativos por ID, también pueden ser positivos en la ARP y negativos por ID, pero difícilmente es positivo por ID y negativo por ARP (29).

2.4- Justificación

La brucelosis en perros causada por *Brucella canis*, es una enfermedad que termina con la vida reproductiva de un perro que pudiera ser de alto valor genético, es potencialmente transmisible al ser humano y causante de enfermedad, por lo que, es necesario aportar información confiable para conocer el comportamiento de los 3 diferentes antígenos más usados en los laboratorios de México para el diagnóstico serológico de la enfermedad. La prueba de aglutinación rápida en placa es fácil de realizar y de interpretar y los resultados se obtienen a los pocos minutos.

Hipótesis

Las metodologías y cepas utilizadas en la elaboración de antígenos de *Brucella canis* para la prueba de aglutinación en placa muestran diferencias en la detección de aglutininas en el suero de los perros.

Objetivos

1. Determinar la sensibilidad y especificidad de los 3 diferentes antígenos (A, B, y C) por medio de la prueba de aglutinación en placa con y sin 2 β ME.
2. Determinar los valores predictivos de los resultados serológicos obtenidos.
3. Determinar la prevalencia de *Brucella canis* en el sur del Distrito Federal en el período de 1994 a 1998.

3.- MATERIAL Y METODOS

3.1- Animales en estudio.

Se muestrearon 182 perros procedentes de diferentes zonas del Distrito Federal remitidos al Departamento de Reproducción e Inseminación de la FMVZ, Hospital para Pequeñas Especies de la FMVZ, consultorios y clínicas particulares y a un albergue canino durante el período comprendido entre 1994 a 1998. El muestreo fue por conveniencia por lo tanto hay diferentes edades y razas, así como el estado general del animal. Para el análisis estadístico se consideraron la edad, sexo y tratamientos aplicados (Tabla 5 y Tabla 6).

3.2- Muestras sanguíneas

Se colectaron las muestras de la vena radial utilizando jeringas de 10 ml., con aguja del número 21, 5 ml se sembraron inmediatamente en tubos que contenían 5 ml de caldo albimi adicionado con citrato de sodio al 1.5% y antibióticos; y los 5 ml restantes se dejaron en la jeringa en posición inclinada con el émbolo ligeramente retraído hasta que se formó el coágulo para posteriormente separar el suero (aproximadamente 1.5 ml) por decantación a tubos estériles 13x100 con tapón de rosca, los cuales fueron centrifugados a 3000 rpm/5 minutos. se colectó el suero y se depositó en tubos eppendorff previamente identificados y se congelaron a -20 C hasta su utilización. En el caso de los consultorios particulares, clínicas particulares, hospital para pequeñas especies y el Departamento de Reproducción e Inseminación de la FMVZ las muestras fueron enviadas ya en el medio de cultivo con anticoagulante y en tubos para sangrado sin anticoagulante o en jeringas. y anexo la hoja de datos diseñada para recabar la información requerida.

3.3- Medios de cultivo

Para el hemocultivo se utilizó caldo albimi¹ adicionado con citrato de sodio al 1.5% ; posterior a la esterilización se le agregó los siguientes antibióticos: cicloheximida 100mg/lt, bacitracina zinc 25,000 UI/lt y polímixina B 6.000 UI/lt previamente esterilizados por filtración² (0.22 µ); una vez hecha la mezcla se depositaron 5 ml en tubos de vidrio de 15x150 con tapón de rosca.

¹ Lab. Difco, Detroit Michigan.

² Millipore

El agar brucela sin antibióticos se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante³ en cajas de Petri de plástico de 100 mm de diámetro con 15 a 20 ml por caja.

3.4- Estudio bacteriológico

El hemocultivo preparado con caldo albini y citrato de sodio más los 5ml de sangre fue refrigerado a 4 C durante 12-18 horas y posteriormente incubado a 37 C haciendo subcultivos en agar brucela a los 3, 5 y 7 días de incubación en agar tripticosa soya agar (TSA), el cual se incubó tres días como mínimo a 37 C en aerobiosis, en caso de aislamiento de *Brucella canis* en el primer subcultivo ya no se realizaron los siguientes. El hemocultivo se agitó antes de cada subcultivo con el fin de homogenizar su contenido. Las colonias sugerentes a *Brucella canis* se les realizó tinción de Gram para observar morfología y tinción de Ziehl Neelsen modificada para *Brucella* para determinar ácido alcohol resistencia, también se realizaron pruebas de ureasa, producción de H₂S en el medio triple azúcar hierro (TSI) con tira de papel humectada con acetato de plomo y movilidad en una preparación húmeda.

3.5- Estudio serológico

Todos los sueros fueron probados con los tres antígenos mediante las pruebas de aglutinación rápida en placa (ARP) con 2β mercaptoetanol (ARP-2βME) y sin 2β mercaptoetanol (61). La prueba inicial fue la ARP y se realizó con una cantidad constante de 50 µl de suero y 50 µl de antígeno, y a los sueros que mostraron reacción de aglutinación se les hicieron diluciones desde 1:25 hasta 1:800 con y sin 2β ME (41). En el presente estudio no se consideró grado de aglutinación como lo reportan Flores Castro y Carmichael (64).

Agglutinación rápida en placa sin 2 β ME: Se colocó 40 µl de suero en una laminilla de vidrio y se agregó la misma cantidad de antígeno, esto se repitió con los tres diferentes antígenos. Se mezclaron con un palillo de madera durante 1 minuto y se hizo la lectura después de tres minutos por medio de un microscopio estereoscópico de luz invertida con los objetivos de 10x y 45x. A los sueros positivos se les realizaron diluciones para determinar títulos de anticuerpos de la misma manera descrita.

Agglutinación rápida en placa con 2 β ME: Se colocó 50 µl de suero se le agregó la misma cantidad de 2β ME al 0,2 M y se mezcló con un palillo de madera por 1 minuto, una vez pasado este tiempo se le agregaron 50 µl

³ Lab. Difco, Detroit Michigan.

del antígeno y se continuó mezclando por 3 minutos. se hizo la lectura como en la prueba anterior. A los sueros positivos se les realizaron diluciones para determinar títulos de anticuerpos. Las diluciones se realizaron de la siguiente manera: se depositan separadamente 80, 40, 20, 10, y 5 μ l de suero en una placa de vidrio cuadrículada adicionando 50 microlitros de 2 β ME al 0.2 M se mezcló con un palillo como se describió anteriormente, a cada cantidad se le agregó 50 μ l de antígeno, el procedimiento se repitió con cada antígeno. Las diluciones finales fueron 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 y 1:400 respectivamente. Para obtener la dilución de 1:800, la cantidad de suero fue de 10 μ l de una dilución previa de 1:4 (en 1 ml) con SSF. Con los resultados serológicos obtenidos y los aislamientos se calculó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VP+) y valor predictivo negativo (VP-) para cada antígeno con y sin 2 β mercaptoetanol y por cada dilución (38).

Tabla 1. Matriz de calculo de Sensibilidad, Especificidad y Valores Predictivos.

Serología	Aislamiento		Total
	(+)	(-)	
(+)	A	B	A+B
(-)	C	D	C+D
Total	A+C	B+D	
SENSIB.	A/(A+C)	VP (+)	A/(A+B)
ESPECIF	D/(B+D)	VP (-)	D/(C+D)

Las definiciones de sensibilidad y especificidad son las señaladas por Brown *et al.* (38).

3.6- Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante la transformación de los títulos en logaritmo base 2 y se les realizó un análisis de varianza con un modelo que incluye efectos fijos de tratamiento (A-con, A-sin, B-con, B-sin, C-con y C-sin), edad, aplicación de antibióticos y sexo del perro. La comparación entre los promedios se realizó con la prueba de Tukey. También se realizó un análisis de correlación entre los resultados de los 3 antígenos con 2 β ME.

3.7- Preparación de Antígenos

Antígeno A. Se utilizó la cepa RM 6-66 (M-)* para la elaboración del antígeno. Se sembró una ampollita de la bacteria liofilizada en una caja con medio de agar sangre. se incubó aeróbicamente a 37 C/48 horas.

* Donada por el Dr. Leland Carmichael

Una vez crecida se cosecharon las colonias por arrastre con asa bacteriológica y se mezclaron en un tubo con 10 ml de solución amortiguada de fosfatos (SAF) 0.15 M ajustado a un pH 7.2, se inoculó posteriormente 1 ml de esta mezcla en cada tubo con medio de tripticasa soya agar inclinado (61) y haciendo movimientos giratorios se sembró toda la superficie, se incubaron aeróbicamente a 37 C/48 horas. Una vez crecidas se cosecharon agregando 2 ml de SAF por cada tubo y con un hisopo estéril se separaron las colonias, se tomó el líquido con pipetas Pasteur estériles y se inocularon las botellas de Roux que contenían medio sólido al 2% de agar brucela (200 ml), para extender homogéneamente el inóculo en toda la superficie se agregaron perlas de vidrio estériles de 6 mm de diámetro y con movimiento suave se extendió el líquido por toda la superficie, las botellas se invirtieron e incubaron aeróbicamente a 37 C/48 horas. Una vez crecida, se cosecharon nuevamente agregando 10 ml de SAF en cada botella. Con movimientos giratorios con las perlas de vidrio sobre el agar se precedió a separar las colonias bacterianas. La biomasa se decantó en botellas de 250 ml para centrifuga y para separar las perlas y restos de agar se pasó por un embudo con 6 capas de gasa estériles donde las perlas y los restos de agar fueron detenidas.

El paquete celular se lavó 3 veces con SAF a 8,000 rpm/15 minutos, se estandarizó al 6% con un tubo capilar y una centrifuga para hematocrito durante 5 minutos. Se decantó el líquido sobrante y se inactivó por medio de calor en baño de agua a 60 C/1 hora. Se tiñó con rosa de Bengala al 1% durante toda la noche a 4 C en agitación magnética. Se le agregó thimerosal a una concentración de 0.01% como conservador, el antígeno fue almacenado a 4 C y estandarizado a un pH de 7.0 a 7.4. Se hicieron dos lavados con SAF para quitar el exceso de colorante, se estandarizó nuevamente el paquete celular al 6% y se almacenó a 4 C hasta su utilización. El antígeno fue desarrollado en el Instituto James A. Baker para la salud animal, Universidad de Cornell, Ithaca, Nueva York, 14850. (61).

Antígeno B. Se preparó un cultivo de *Brucella canis* con cepa de referencia (RM6-66) en botellas Roux, dejándose incubar durante 48 hrs a 36 C aeróbicamente. El cultivo se cosechó en un matríz de 2000 ml, haciéndose pasar la suspensión bacteriana a través de un filtro de gasa y algodón estériles, las bacterias se inactivaron en baño de agua a 90 C/60 minutos. La suspensión se centrifugó a 8000 rpm a 4 C durante 15 minutos. El paquete celular fue resuspendido en 500 ml de solución salina isotónica y se tiñó con rosa de Bengala al 1%, manteniéndose 2 horas en agitación magnética, posteriormente las células se lavaron en dos

ocasiones por medio de centrifugación para eliminar el exceso de colorante. Por último el antígeno se suspendió en una solución amortiguadora de carbonato-bicarbonato con un pH de 8.9, la concentración bacteriana se calculó al 8% en un espectrofotómetro a una densidad óptica de 460 nanómetros. El antígeno se tituló con sueros positivos y negativos obtenidos de conejos inmunizados y no inmunizados a diferentes diluciones. Posteriormente el antígeno se estandarizó con sueros controles obtenidos de perros positivos al aislamiento bacteriológico. El antígeno fue desarrollado en el CENID-Microbiología del INIFAP-SAGAR ubicado en el km 15.5 de la carretera México-Toluca, México, D.F. (31).

Antígeno C. La cepa bacteriana utilizada fue *Brucella canis* cepa RM6-66 (M-) siguiendo el procedimiento desarrollado por Carmichael *et.al.* (61) pero a un pH de 8.6 para evitar ocasionalmente la formación de grumos. Este antígeno fue elaborado en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la F.M.V.Z. de la U.N.A.M. México (71).

4.- RESULTADOS

4.1- Serología

El análisis de varianza de los títulos de anticuerpos transformados a logaritmo base 2 con un modelo que incluye efectos fijos de tratamiento (A-con, A-sin, B-con, B-sin, C-con y C-sin), edad (0-2, 2-4, 4-6 y >8 años), antibiocrápia y sexo del perro indica que no hay diferencia entre los antígenos con 2β ME, ni entre los antígenos sin 2β ME sin embargo, el antígeno C-con además de ser estadísticamente similar a B-con y A-con, también es estadísticamente compatible con A-sin y B-sin, es decir, no hubo diferencia por el tratamiento del suero con o sin 2β ME frente a los antígenos A y B (Tabla 2).

Tabla 2.- Resultados del análisis de varianza de los títulos serológicos convertidos a logaritmo base 2, considerando que > a 0.05 no hay diferencia estadísticamente significativa con un 95% de intervalo de confianza.

Antígenos	Resultado	Antígenos	Resultado
A-con vs B-con	0.8098	A-sin vs B-sin	0.8299
A-con vs C-con	0.2855	A-sin vs C-sin	0.1292
B-con vs C-con	0.1907	B-sin vs C-sin	0.0833
C-con vs A-sin	0.1590	C-con vs B-sin	0.2325

La comparación entre los promedios se realizó mediante la prueba de Tukey.

El análisis de correlación entre los resultados en log 2 para los antígenos con 2 β ME muestran una alta correlación, la correlación del antígeno A con B es la mayor y la menor entre el antígeno B con C (Tabla 3).

Tabla 3.- Porcentaje de correlación entre los resultados de los 3 antígenos con 2 β ME.

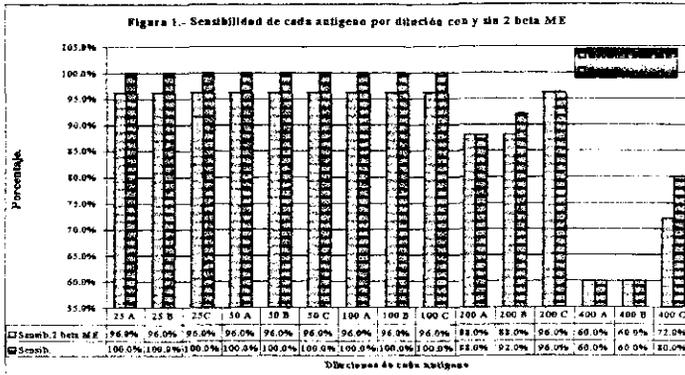
Antígenos		% DE CORRELACIÓN
A-con	B-con	98.754
A-con	C-con	94.558
B-con	C-con	93.003

4.2- Sensibilidad entre los 3 antígenos.-

En términos generales la sensibilidad es alta (96%) hasta la dilución 1:100 para los 3 antígenos con 2β ME y de 100% sin 2β ME, disminuye a 88% en la dilución 1:200 en los antígenos A y B únicamente con 2β ME,

mientras que el antígeno C se mantiene en 96%, en la dilución 1:400 con 2β ME los antígenos A y B bajan hasta un 60% de sensibilidad y el antígeno C baja a 72% de sensibilidad. (Figura 1).

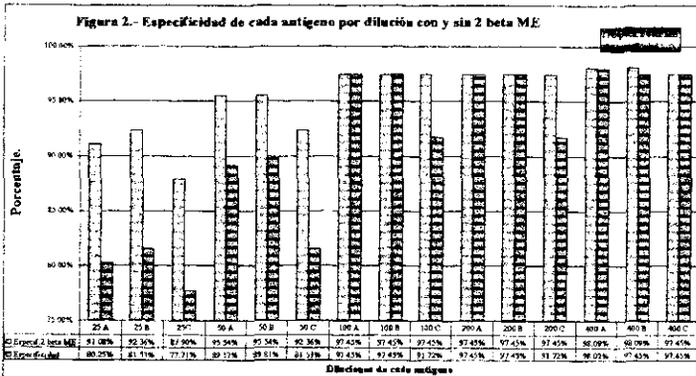
Sin 2β ME la sensibilidad es del 100% hasta la dilución 1:100 para los 3 antígenos; disminuye a 88, 92 y 96% respectivamente en la dilución 1:200 y en la dilución 1:400 a un 60% para los antígenos A y B, mientras que el antígeno C sólo baja a 80% de sensibilidad (Figura 1).



4.3- Especificidad entre los 3 antígenos.-

La especificidad entre los 3 antígenos tanto con 2β ME como sin 2β ME tiene una relación directamente proporcional al aumento de las diluciones. La tendencia de aumento es clara en los 3 antígenos aunque el antígeno C muestra una menor especificidad en las diferentes diluciones con respecto a los antígenos A y B; en la dilución 1:100 y 1:200 no hay diferencia entre los 3 antígenos con 2β ME pero si hay una diferencia menor del antígeno C con respecto al A y al B sin 2β ME. Se observa un comportamiento más uniforme cuando se aplica el tratamiento con 2β ME al suero (Figura 2).

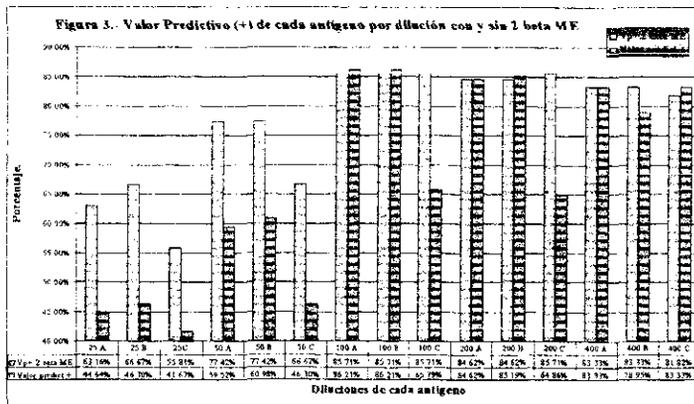
La especificidad obtenida con los sueros no tratados con 2β ME, también muestran un comportamiento directamente proporcional conforme aumentan las diluciones, sin embargo la especificidad del antígeno C se mantiene por debajo de los antígenos A y B. La especificidad disminuye a partir de la dilución 1:400 en los 3 antígenos (Figura 2).



4.4- Estudio del Valor predictivo positivo (VP+) entre los 3 antígenos.-

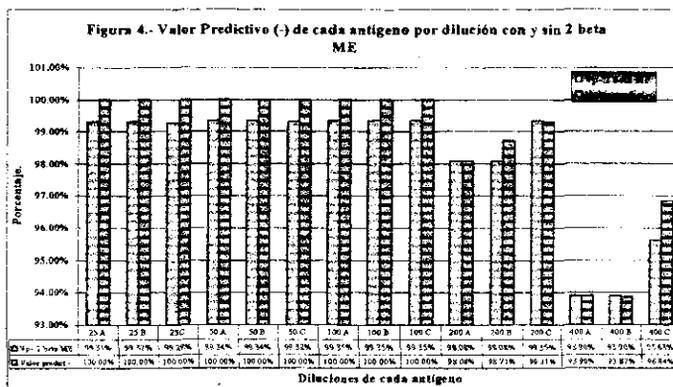
El VP+ es relativamente bajo y tiene un comportamiento similar de aumento en los 3 antígenos conforme el suero es más diluido. Se observa un aumento de los 3 antígenos hasta la dilución 1:100 y disminuye a partir de 1:200 con y sin 2β ME. En este caso el antígeno C se mantiene por debajo de los otros 2 antígenos en la dilución 1:25, 1:50 y 1:400 con 2β ME, igualándose en la dilución 1:100 y aumentando ligeramente en la dilución 1:200 con 2β ME (Figura 3).

En los sueros no tratados con 2β ME, el valor del antígeno C permanece por debajo del antígeno A y B en casi todas las diluciones excepto en la dilución 1:400 que iguala al antígeno A y supera a B (Figura 3).



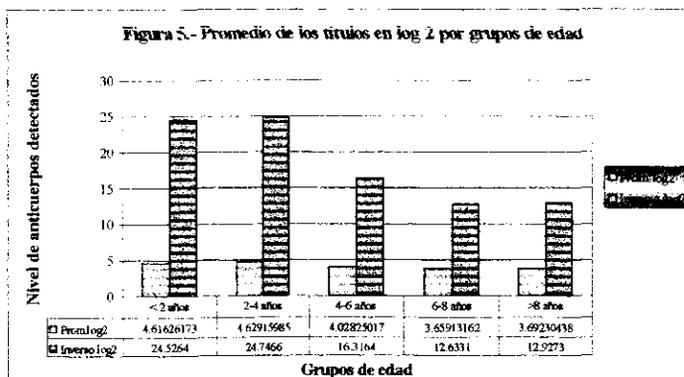
4.5- Estudio del Valor predictivo (VP-) entre los 3 antígenos.-

La variable VP- muestra un comportamiento muy similar entre los 3 antígenos hasta la dilución 1:100 tanto con el tratamiento de 2β ME como sin él. En la dilución 1:200 el valor disminuye en los 3 antígenos aunque



un poco menos el C, en la dilución 1:400 disminuye aún más la especificidad en los 3 antígenos tanto con y sin 2β ME, sin embargo el antígeno C disminuye menos que los otros 2 antígenos (Figura 4).

Relativamente se observa una disminución en el promedio de títulos conforme aumenta la edad, el grupo con los títulos más altos fué el de los animales de 2-4 años, en segundo lugar esta el grupo >2 años, en tercero el grupo de 4-6 años y sin diferencia marcada están los siguientes grupos > de 8 años y el grupo de 6-8 años



(Figura 5).

En referencia al porcentaje de reactores en las diferentes diluciones, de todos los perros muestreados existe una tendencia a la disminución de dicho porcentaje conforme aumentan las diluciones, sin embargo, la dilución 1:400 sale de esa relación al ocupar la primera posición en el porcentaje de los sueros reactores con un 9.2% seguido de la dilución 1:50 (5%) y 1:25 con un 4.8% (Tabla 4).

Tabla 4.- Porcentajes de perros que reaccionaron por títulos:

Título	%
0	73.7 %
1:25	4.8 %
1:50	5.1 %
1:100	1.7 %
1:200	3.8 %
1:400	9.2 %
1:800	1.7 %
Total:	100 %

De los 182 perros muestreados 108 fueron machos (59.34%) y 74 fueron hembras (40.66%); del total, en 25 perros (13.73%) se logró el aislamiento bacteriológico de *Brucella canis*. En los machos hubo 15 aislamientos (8.23%) y en las hembras solo 10 (5.5%) (Tabla 5) sin embargo son proporcionales los aislamientos con respecto a la cantidad de hembras y machos muestreados.

Tabla 5.- Porcentaje y cantidad de aislamientos por sexo.

	MACHOS	%	HEMBRAS	%	TOTAL	%
No. De perros	108	59.34%	74	40.66%	182	100%
Aislamiento %	15	8.24%	10	5.5%	25	13.73%
Sin Aislamiento %	93	51.11%	64	35.16%	157	86.27%

En tres hemocultivos se aisló *Staphylococcus.spp*, en escasa cantidad, por lo que es probable que se trate de bacterias contaminantes.

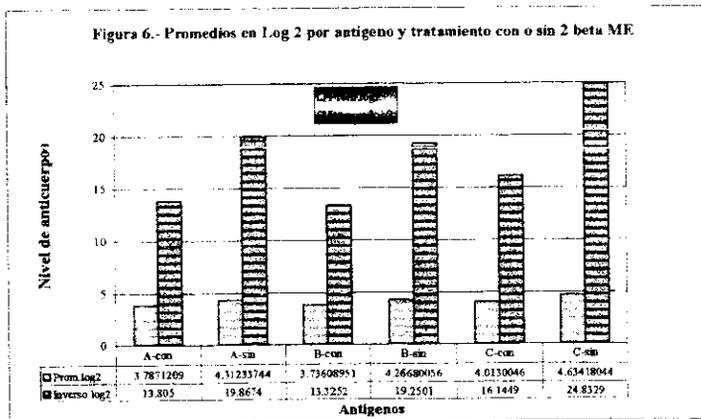
La edad promedio de los animales que tuvieron aislamientos fue de 2 a 4 años con 9 aislamientos y a partir de los 8 años de edad la cantidad de aislamientos disminuye drásticamente coincidiendo con una menor cantidad de muestras (Tabla 6). La distribución de los perros conforme a sus edades es como sigue: los grupos de edad más muestreados son los de 2-4 años, 4-6 años y menores de 2 años (Tabla 6).

Tabla 6.- Aislamientos por edad y porcentaje de ellos.

Edad (años):	Aislamientos	% de Aislamiento	Sin Aislamiento	Total de animales	% de perros por edad
< 2	3	1.65%	35	38	20.88%
> = 2 < 4	9	4.95%	49	58	31.86%
> = 4 < 6	6	3.30%	33	39	21.43%
> = 6 < 8	6	3.30%	16	22	12.09%
> = 8 < 10	1	0.53%	14	15	8.24%
> = 10 < 12	0	0%	7	7	3.85%
> = 12 < 14	0	0%	2	2	1.10%
> = 14 < 16	0	0%	1	1	0.55%
Totales	25	13.73%	157	182	100

Del total de los animales el 24.2% recibió algún tratamiento antibacteriano durante la toma de la muestra sanguínea para el hemocultivo y la prueba serológica. El título promedio en log base 2 para los tratados fue de 4.10369621 (1:17.19) y para los no tratados fue de 4.14634689 (17.70) siendo los no tratados los que tuvieron un título ligeramente más alto sin ser estadísticamente significativo ni tampoco con valor para considerarse como concluyente ya que no sabemos el curso de los tratamientos.

Se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05\%$) en el título promedio entre los que no tuvieron aislamiento con 0.51230343 (1:1.426) y los que fueron positivos al aislamiento con 7.73773967 (1:213.45).



Por sexo la diferencia no fue estadísticamente significativa ($P < 0.05\%$) las hembras tuvieron un título de 4.18328247 (1:18.16) y los machos de 4.06676064 (1:16.75).

Es claro que los promedios de los sueros que no fueron tratados con 2 β ME tienen un título mayor que los que fueron tratados con 2 β ME y entre los antígenos, el antígeno C fue el que mayor título alcanzó en promedio. seguido del antígeno A y finalmente el antígeno B tanto en los sueros tratados con 2 β ME como los no tratados con 2 β ME (Figura 6).

5.- DISCUSIÓN:

En el presente trabajo se estudió el comportamiento de tres diferentes antígenos utilizados para el diagnóstico serológico de la brucelosis canina por medio de la prueba de aglutinación en placa con y sin 2β ME comúnmente usados en diferentes laboratorios, con el objetivo de encontrar entre ellos alguna diferencia estadísticamente significativa de sensibilidad o especificidad ya que uno de ellos se elaboró con una cepa diferente de *Brucella canis*, así como utilizó una metodología diferente (B) a la elaboración de los otros 2 antígenos (A y C). Por otro lado, vale la pena mencionar que los antígenos A y el C fueron preparados utilizando la misma cepa y la misma metodología, aunque el antígeno A se elaboró con un pH de 7.0 a 7.4 y el antígeno B con un pH de 8.6. Es importante mencionar que no hay protocolos estandarizados de elaboración de antígenos para la ARP ni para el serodiagnóstico (1,65).

Estadísticamente no hay diferencia entre los 3 antígenos al agregarles 2β ME con un 95% de Intervalo de Confianza (IC), lo que indica que el comportamiento de los antígenos es estable frente a un mismo suero y bajo similares condiciones de manejo e interpretación de la prueba, estos resultados son muy parecidos a lo que encontró Mateu de Martín entre antígenos para ARP 2β ME con un 0.97 (valor Kappa) de similitud en los resultados con un 95% de intervalo de confianza (65). El antígeno C con 2β ME por su mayor sensibilidad y menor especificidad estadísticamente es muy similar a los antígenos A y B sin el tratamiento de 2β ME, es decir no se observó el efecto del 2β ME en el suero frente al antígeno C, situación que se debe considerar para este antígeno. El porcentaje de concordancia entre los antígenos es muy parecido (98.9%) a lo reportado por House and Bakadsh (38,49). Esto se debe a que el comportamiento de la prueba es muy estable aún con antígenos diferentes.

Entre los antígenos sin el tratamiento de 2β ME no hay diferencia estadística lo que confirma que hay un comportamiento muy parecido y estable frente a un mismo suero y bajo similares condiciones de manejo e interpretación de la prueba. El antígeno C-sin sí se diferencia con el A-con y B-con estadísticamente demostrado.

En lo que se refiere a la sensibilidad, ésta es de 96% a bajas diluciones y disminuye conforme aumentan éstas, por lo tanto conforme disminuyen los anticuerpos también disminuye su capacidad aglutinante de los

anticuerpos específicos que quedan en el suero. Una sensibilidad mayor de un antígeno se debe a que tiene más epítopes intactos y disponibles con capacidad de unirse a los anticuerpos específicos bajo las mismas condiciones que otros antígenos menos sensibles y esto puede deberse a la cepa utilizada y al procedimiento para la elaboración del antígeno. Aunque existe estandarización de lectura la ARP es una prueba subjetiva, pudiendo haber unión Ag-Ac sin haber fenómeno de aglutinación. Considerando la dilución 1:200 como punto de corte e indicador de bacteremia tanto por la ARP 2 β ME como por la AT 2 β ME por su alta correlación entre estas 2 pruebas (1,14), la sensibilidad es más del 85% para los 3 antígenos, siendo ésta relativamente alta y comportándose los 3 antígenos de manera muy parecida (Figura 1). Brown *et al.*, encontró una sensibilidad de 62.5% con un antígeno comercial a base de *Brucella ovis* (38).

Es lógica la disminución de la sensibilidad conforme va diluyéndose el suero frente a una cantidad constante de antígeno porque es posible un fenómeno de prozona, es decir hay pocos anticuerpos capaces de aglutinar al antígeno presente, de hecho si hay unión Ag-Ac como se mencionó anteriormente sólo que no es capaz de manifestarse visiblemente.

En referencia a la especificidad, esta es alta para esta prueba (87.90% a 98.09%) muy cerca del 99.7% que menciona Brown *et al* (38) y en este trabajo es directamente proporcional al incremento de las diluciones. Es decir que conforme se diluye el suero, el antígeno detecta únicamente las reacciones específicas Ag-Ac y descarta las reacciones inespecíficas ya que la cantidad de anticuerpos inespecíficos normalmente son bajos que máximo alcanzan la dilución 1:50 y al usar una cepa de *Brucella canis* con respecto al uso de otros antígenos preparados con otras especies de brucelas rugosas (*Brucella ovis*) se disminuye la cantidad de epítopes que pudieran reaccionar con anticuerpos inespecíficos y aparezcan reacciones de aglutinación no por exposición a *Brucella canis*; al agregar 2 β ME al suero con respecto al que no se le agregó, la especificidad no mostró una diferencia significativa por lo que se puede decir que es el antígeno mismo el que genera la especificidad y no tanto por el tratamiento del 2 β ME, sin embargo a diluciones bajas si hay un incremento de especificidad por efecto del 2 β ME de aproximadamente un 6% a un 10% que es debido a la capacidad del 2 β ME de inactivar anticuerpos inespecíficos, es decir rompe enlaces disulfuro de IgM's con capacidad aglutinante pero menos específicas contra *Brucella canis* (65). Nuevamente el antígeno C se comporta diferente a los antígenos A y B ya que es menor que ellos (Figura 2). La menor especificidad de este

antígeno se podría deber a que el antígeno expone una gran cantidad de epítopes, éstos son capaces de reaccionar fácilmente con los anticuerpos y por lo tanto tenemos reacciones que pudieran no ser realmente inducidas por *Brucella canis*. Es decir a mayor sensibilidad es menor la especificidad y viceversa.

La prueba, por si misma tiene un bajo a regular valor predictivo positivo que va desde 55.81% a 85.71% con 2 β ME y de 41.67% a 86.21% sin 2 β ME, es decir de un 100% de sueros positivos un 13.79% (100%-86.21%) a un 58.33% (100%-41.67%) son realmente negativos pero la prueba los da como positivos, Sang J. Shin menciona de un 20 a 50% aunque puede llegar a 75% (1), Hubbert encontró un 14.5% comparando la AT 2 β ME con ARP y Flores Castro menciona un 60% para la ARP (64); por lo que esta es una desventaja de la prueba no importando el antígeno usado ni aún agregando 2 β ME, Sang J. Shin menciona que al agregar 2 β ME en una prueba de ARP con cepa M- reduce máximo un 10% de falsos positivos (1) en el presente estudio se redujo casi un 15% al agregar el 2 β ME hasta la dilución 1:50, 1% en la dilución 1:50 y hasta casi un 20% en la dilución 1:100 y 1:200; esto se debe tomar en cuenta para considerar el resultado que puede ser falso positivo debido a la presencia de anticuerpos con capacidad aglutinante pero no específicos contra *Brucella canis*. El comportamiento de la prueba es de un aumento del valor predictivo positivo (disminución de falsos positivos) conforme aumentan las diluciones hasta la dilución 1:100 y posteriormente hay un decremento de este parámetro sin haber diferencia significativa entre los antígenos utilizados (Figura 3). Esto es detectamos menos falsos positivos. El que el valor predictivo positivo sea relativamente bajo en esta prueba en las diluciones más bajas es que los antígenos y específicamente ciertos epítopes favorecen la unión de elementos capaces de aglutinar (abundantes en diluciones bajas) por lo que se originan reacciones de aglutinación que no se deben a la enfermedad. Mateu de Martín *et al.* atribuyen este fenómeno a IgM's por su gran tamaño molecular y capacidad aglutinante (65), Badakhsk *et al* menciona simplemente aglutininas no específicas (41). Ahora bien, el que disminuyan los falsos positivos conforme las diluciones aumentan se debe al diluirse el suero también se diluyen los elementos capaces de aglutinar pero que no son específicos, por lo tanto, algún efecto de aglutinación se deberá a reacciones específicas de aglutinación. Sin embargo, en raras ocasiones algunos sueros de perros tienen tantos elementos inespecíficos de aglutinación que aún a diluciones altas siguen aglutinando originando falsos positivos.

En relación al valor predictivo negativo, si la prueba da un 100% de negativos, el porcentaje de los que realmente son negativos es alto por lo que sólo de un 0.65% a un 6.1% con 2 β ME serían realmente positivos y de un 0% a 6.13% sin 2 β ME serían realmente positivos pero la prueba por sí misma los está dando como resultados falsos negativos. Esto es debido a que al tener los antígenos y la prueba tanta sensibilidad es muy difícil que la prueba no evidencie a sueros positivos siendo pocos sueros de perros en la naturaleza lo que no expresan aglutinación debido a que carecen de elementos capaces de aglutinar a los antígenos, por eso de casi todos los negativos un alto porcentaje son realmente negativos porque la prueba tiene una capacidad muy importante para detectar los sueros positivos y falsos positivos. A diluciones altas un suero aunque sea positivo pueda ser que no aglutine el antígeno y la prueba lo detecte como falso negativo, lo cual es poco común para la ARP con *Brucella canis* M- como antígeno. Los 3 antígenos se comportan muy parecido pero a mayor dilución el antígeno C detecta menos falsos negativos que los antígenos A y B (Figura 4). Esto se debe a que es más sensible que los antígenos A y B, lo que le impide dejar de detectar reacciones de aglutinación cuando hay anticuerpos por lo que ningún suero negativo en la prueba de ARP 2 β ME da resultados positivos por otras pruebas serológicas según Mateu de Martín *et al* (66) y Nicoletti (29).

La prueba serológica ARP 2 β ME es un método para el diagnóstico de la infección en perros por *Brucella canis* pero es necesario ver su comportamiento como prueba diagnóstica con cepas y metodologías diferentes de antígenos que rutinariamente se utilizan en los laboratorios de diagnóstico de México para la detección de esta enfermedad, es usado por su facilidad de realización, simplicidad en la interpretación, reproducibilidad, rapidez y porque es tan sensible que a la segunda semana postinfección es posible que detecte anticuerpos mientras que la AT los detecta hasta la tercer semana (41), sin embargo, la prueba de ARP por sí sola no es 100% confiable, por lo que se tiene que combinar con uno o más métodos diagnósticos y repetir la prueba de 2 a 3 semanas después de la primera evaluación para confirmar una estabilidad o aumento en el título de anticuerpos. Sang J. Shin *et al* (1) y Badakhsk *et al*. (41) mencionan una alta correlación entre AT 2 β ME y ARP 2 β ME por lo que un perro negativo puede estar de menos o igual a la dilución 1:50, sospechoso 1:100 y positivo a partir de 1:200. Brown *et al* (38), Flores Castro *et al* (39), Hubbert *et al* (14), Thiermann (40) y Creck (72) mencionan la dilución 1:200 como indicativo de positividad a la enfermedad.

Con respecto a la presentación de la enfermedad por grupos de edades los perros de 2-4 años son los que tienen el título promedio más alto coincidiendo con que dentro de esta edad se obtuvieron la mayor cantidad de aislamientos con un 4.95% de total de los perros muestreados debido a que es la edad que más abunda en los criaderos (en este estudio fue la edad con más animales con un 31.86%) y reproductivamente es la más activa.

En otros resultados, 134 perros de 182 (73.63%) no se les detectó anticuerpos y un 26.37% tuvo anticuerpos desde 1:25 hasta 1:800 que fue la dilución hasta la cual se trabajó para todos los antígenos, resalta que a pesar de ser un problema reproductivo importante existe una prevalencia de sólo 14.6%, a partir de una dilución 1:200. Flores Castro y Segura (43) reportan una prevalencia del 28%, Gutierrez (46) reporta 11.2% y Moguel (52) reporta 12%, todos ellos en México. La dilución 1:400 es la segunda dilución en porcentaje con un 9.2% de los animales (17 animales) lo que indica que cuando un perro tiene bacteremia los títulos tienden a ser altos. Mientras que Nicoletti *et al* (29) encontró que a partir de la dilución 1:200 de un 50 a un 75% se les logra aislar la bacteria de sangre, Bakadhsh *et al* (41) encontró un 86% en el presente estudio de los 25 aislamientos 24 de ellos tenían como mínimo 1:200 o más y sólo 1 era menor a 1:200 siendo el 96% de los positivos al aislamiento.

Por sexo no existió diferencia significativa entre los promedios, aunque las hembras tuvieron 4.18328247 (1:18.17) y 4.06676064 (1:16.76) para los machos. Es importante mencionar que aunque se muestrearon más machos (108) que hembras (74) y que los machos tuvieron 15 aislamientos contra 10 de las hembras estos resultados son proporcionales, esto indica que la enfermedad se distribuye igual en ambos sexos afectando sin predilección algún sexo en particular, es decir, un macho puede afectar a una hembra y viceversa aunque es más frecuente la primera opción porque un macho semental copula con varias hembras, es por tanto una enfermedad de transmisión sexual.

De los animales muestreados el 75.8% había recibido algún tratamiento con antibióticos durante el muestreo, este grupo de animales tuvo un título promedio en logaritmo base 2 de 4.10369621 (1:17.2) y el grupo de animales que no recibieron algún tratamiento con antibióticos fue el 24.2% con un título promedio en logaritmo base 2 de 4.14634689 (1:17.71), la diferencia no es estadísticamente significativa y es términos

generales es un título menor a 1:25 en promedio sin poder concluir en este caso que la antibioterapia haya influido en la disminución de los títulos de anticuerpos porque el objetivo del trabajo y la metodología no lo permitieron.

La diferencia en promedio de los animales positivos al aislamiento con respecto a los animales que no se les aisló la bacteria es significativa; para el primer grupo el promedio en logaritmo base 2 fue de 7.73773967 (1:213.45) y para el segundo grupo fue de 0.51230343 (1:1.42). El 13.73% de los perros tuvo aislamiento que es muy similar al 11.8% encontrado por Flores Castro *et al* (39).

El promedio de los títulos es más alto para el grupo de sueros que no fueron tratados con 2β ME que para el grupo de sueros tratados con 2β ME y es explicable ya que el 2β ME disminuye las reacciones inespecíficas en la prueba de aglutinación y reacciones por anticuerpos del tipo IgM. Bakadhsh *et al* menciona que los resultados más altos en los sueros no tratados con 2β ME podría deberse a que los animales están en una fase temprana de la enfermedad donde abundan los anticuerpos del tipo IgM o que estos animales puedan tener macroglobulinas no específicas con capacidad aglutinante (41). Sin embargo entre los antígenos y sueros que se les adicionó 2β ME el antígeno C fue el que mayor promedio obtuvo coincidiendo con que fue el antígeno más sensible y el de menor especificidad, seguido del antígeno A y finalmente del B (Figura 5).

6.- CONCLUSIONES:

Los resultados revelan que:

1. No hay diferencia estadísticamente significativa ($P<0.05$) en los resultados de sensibilidad, especificidad y valores predictivos obtenidos entre los 3 antígenos con 2 β ME enfrentados a un mismo suero por medio de la prueba de aglutinación en placa, excepto entre el antígeno C-con que reaccionó muy parecido con A-sin y B-sin, así como con A-con y B-con debido a su alta sensibilidad.
2. Entre el usar y no usar el 2 β ME si hay diferencia significativa ($P<0.05$) sin embargo, entre los mismos antígenos con el mismo tratamiento sin o con 2 β ME no hay diferencia estadística significativa ($P<0.05$).
3. Es necesario enfrentar a un mismo suero con y sin 2 β ME para detectar la enfermedad en fases tempranas.
4. La sensibilidad es buena para los 3 antígenos considerando que es mayor a un 85% hasta la dilución 1:200 que es la dilución indicativa de bacteremia, siendo el antígeno C el más sensible de los 3 probados.
5. La especificidad de los antígenos es también alta siendo más del 95% hasta la dilución 1:200 siendo el antígeno C el menos específico básicamente a diluciones bajas.
6. El valor predictivo positivo es bajo para los 3 antígenos siendo el antígeno C el que más falsos positivos determina, por lo que la prueba por si misma no es confiable para usarse como única prueba diagnóstica para esta enfermedad.
7. El valor predictivo negativo de la prueba es muy alto, siendo del 98% para el antígeno A y B, y casi del 100% para el C en la dilución 1:200 por lo que en general la prueba es muy confiable para detectar a los verdaderos negativos y principalmente el antígeno C.
8. La edad en la cual la presentación de la enfermedad es más común es de 2-4 años, seguida de los menores de 2 años afectando de manera indistinta hembras y machos.

7.- LITERATURA CITADA

- 1.- Carmichael LE and Shin SJ. Canine Brucellosis: A diagnostician's dilemma. Semin. Vet. Med. Surg. (Small Anim.) 1996; 11:161-165 .
- 2.- Díaz AE, Hernández AL, Velazquez QF, Valero EG. Diagnóstico de Brucelosis Animal. INIFAP 1997. México.
- 3.- Carmichel LE, Bruner DW. Characteristics of newly recognized species of *Brucella* responsible for infectious canine abortion. Cornell Vet 1968; 58: 579-592 .
- 4.- Carmichael LE, Kenney RM. Canine abortion caused by *Brucella canis*. JAVMA 1968; 152:605-616.
- 5.- Carmichel LE, George LW. Canine brucellosis: Newer knowledge. Biol.Standar 1976; 31:237-250.
- 6.- Moore JA. *Brucella canis* Infection in Dogs. JAVMA 1969; 155:2034-2037.
- 7.- Moore JA, Gupta BN. Epizootiology, Diagnosis, and Control of *Brucella canis*. JAVMA 1970; 156:1737-1740.
- 8.- Forbes LB, Pantekoek JF. *Brucella canis* isolates from canadian dogs. Can Vet J 1988; 29:149-152.
- 9.- Zoha SJ, Carmichael LE. Properties of *Brucella canis* surface antigens associated with colonial mucoidiness. Cornell Vet 1981; 71:427-438.
- 10.- Does SB, Hollis DG, Weavwe RE, Moss CW. Cellular Fatty Acids of *Brucella canis* and *Brucella suis*. J Clin Microbiol 1981; 14:111-112.
- 11.- Santos JM, Verstrete DR, Perera VY, Winter AJ. Outer Membrane Proteins from Rough Strains of four *Brucella* Species. Infec Immun 1984; 46:188-194.
- 12.- Carmichael LE, Joubert JC, Jones L. Characterization of *Brucella canis* protein antigens and polipeptide antibody responses of infected dogs. Vet Microbiol 1983; 19:979-987.
- 13.- Carmichael LE, Kenney RM. Canine Brucellosis: The clinical disease, pathogenesis and immune response. JAVMA 1970; 156:1726-1734.
- 14.- Hubbert NL, Bech NS, Barta O. Canine brucellosis: Comparasion of clinical manifestations with serologic test results. JAVMA 1980; 177:168-171.
- 15.- Swenson RM, Carmichael LE, Cundy KR. Human Infection with *Brucella canis*. Ann Int Med 1972; 76:435-438.

- 16.- Hoff GL, Bigler WJ, Trainer DO, Debbie JG, Brown GM, Winkler WG, Richards SH, Reardon M. Survey of Selected Carnivore and Opossum Serums for Agglutinins to *Brucella canis*. JAVMA 1974; 165:830-831.
- 17.- Percy DH, Egbu IN, Jonas AM. Experimental *Brucella canis* Infection in the Monkey (*Macaca arctoides*). Can. J. Comp. Med 1972; 36:221-225.
- 18.- Randhawa AS, Dieterich WH, Hunter, CC, Kelly VP, Johnson TC, Svoboda B, Wilson, DF. Prevalence of Seropositive Reactions to *Brucella canis* in a limited Survey of Domestic Cats. J Am Vet Med Assoc 1977; 171 (3):267-268.
- 19.- Randhawa AS, Kelly VP, Baker EF. Agglutinins to *Coxiella burnetii* and *Brucella spp*, with Particular Reference to *Brucella canis*, in Wild Animals of Southern Texas. JAVMA 1977; 171:939-942.
- 20.- Pickerill PA. Comments on Epizootiology and Control of Canine Brucellosis. JAVMA 1970; 156:1741-1742.
- 21.- Carmichel LE, Joubert JC. Transmisión of *Brucella canis* by contact exposure. Cornell Vet 1988; 87:69-79.
- 22.- Serikawa T, Muraguchi T, Nakao N. Significance of Urine-Culture for Detecting Infection with *Brucella canis* in Dogs. Jap. J Vet Sci 1978; 40:353-355.
- 23.- Serikawa T, Muraguchi T, Muraguchi T. Significance of Urine in Transmission of Canine Brucellosis. Jap J Vet Sci 1979; 41:607-616.
- 24.- Briseño GH. Problemas reproductivos asociados a *Brucella canis* en perros machos. (tesis) México (DF): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnia, Universidad Nacional Autónoma de México. 1990.
- 25.- Dawkins BĠ, Matchotka SV, Suchman D, Laughlin RM. Pyogranuloma dermatitis associated with *Brucella canis* infection in a dog. JAVMA 1982; 181:1432-1433.
- 26.- Henderson RA, Hoerlein BF, Kramer TT, Meyer ME. Discospondylitis in Three Dogs Infected with *Brucella canis*. JAVMA 1974; 165:451-455.
- 27.- Mateu-de-Antonio EM, Martín M. In vitro efficacy of several antimicrobial combinations against *Brucella canis* and *Brucella melitensis* strains isolated from dogs. Vet Microbiol 1995; 45:1-10.
- 28.- Nicoletti P, Chase A. The use of antibiotics to control canine brucellosis. Comp small animals 1987; 9:1063-1066.

- 29.- Nicoletti P, Chase A. An evaluation of methods to diagnose *Brucella canis* infection in dogs. *Compendium small animal* 1987; 9:1071-1074.
- 30.- Polt SS, Dismukes WE, Flint A, Schaeffer J. Human brucellosis caused by *Brucella canis*: clinical features and immune response. *Ann Internal Med* 1982; 97:717-719.
- 31.- Vázquez N J, Velázquez QF, Mancera MA. Elaboración de un antígeno específico para el diagnóstico de *Brucella canis*. *Memorias del XXIII Congreso Nacional de Microbiología*; 1992; Acapulco Gro.; México.
- 32.- Hoff GL, Shneider NJ. Serologic survey for agglutinins to *Brucella canis* in Florida residents. *Am J Tropic Med Hygiene* 1975; 24:157-159.
- 33.- Munford RS, Weaver RE, Patton C, Feeley JC, Feldman RA. Human disease caused by *Brucella canis* a clinical and epidemiologic study of two cases. *JAVMA* 1975; 231:1267-1269.
- 34.- Monroe PW, Silberg SL, Morgan PM, Adess M. Seroepidemiological Investigation of *Brucella canis* Antibodies in Different Human Population Groups. *J Clin Microbiol* 1975; 2:382-386.
- 35.- Fox FK, Fox A, Nagpal M, Steinberg P, Heroux K. Identification of *Brucella* by Ribosomal-Spacer-Region PCR and Differentiation of *Brucella canis* from Other *Brucella spp.*, pathogenic for Humans by Carbohydrate Profiles. *J Clin Microbiol* 1998; 36:3217-3222.
- 36.- Carmichael LE, Zoha SJ, Flores CR. Problems in the serodiagnosis of canine brucellosis: dog responses to cell wall and internal antigens of *Brucella canis*. 3rd International Symposium on Brucellosis; 1983; Algiers, Argelia. *Develop Biol Estandar* 1983; 56:371-383.
- 37.- Alton GG, Jones LM, Pictz DE. *Las técnicas de laboratorios en la brucelosis*. 2^o ed. Ginebra, OMS 1976.
- 38.- Brown J, Blue JL, Wooley RE, Dreesen DW, Carmichael LE. A Serologic Survey of a Population of Georgia Dogs for *Brucella canis* and Evaluation of Slide Agglutination Test. *JAVMA* 1976; 169: 1214-1216.
- 39.- Flores CR, Suarez F, Ramirez Pfeiffer C, Carmichael LE. Canine Brucellosis: Bacteriological and Serological Investigation of Naturally Infected Dogs in México City. *J Clin Microbiol* 1977; 6:591-597.
- 40.- Thiermann AB. Brucellosis in Stray Dogs in Detroit. *JAVMA* 1980; 177:1216-1217.

- 41.- Badakhsh FF, Carmichael LE, Douglass JA. Improved rapid slide agglutination test for presumptive diagnosis of canine brucellosis. J Clin Microbiol 1982; 15: 286-289.
- 42.- Akao Larson MHM, Larson CE, Fernandes WR, Olivera Da Costa E, Hagiwara MK. *Brucella canis* Inquéritos sorológico e bacteriológico em população felina. Rev Saude 1984; 8:47-50.
- 43.- Flores CR, Segura R. A serological and bacteriological survey of canine brucellosis in México. Cornell Vet 1976; 66:347-351.
- 44.- Fredrickson LE, Barton CE. A Serologic for Canine Brucellosis in a Metropolitan Area. JAVMA 1974; 165:987-989.
- 45.- Galphin SP. A serologic Survey for *Brucella canis* in Dogs on a Military Base. JAVMA 1977; 171:728-729.
- 46.- Gutierrez HR. Contribución al estudio sobre *Brucella canis* en perros nacionales y en perros introducidos al país por la aduana del aeropuerto internacional de la ciudad de México (tesis). México (DF): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 1980.
- 47.- Higgins R, Hoquet F, Bourque R, Gosselin Y. A Serological Survey for *Brucella canis* in Dogs in the Province of Quebec. J Can Vet 1979; 20:315-317.
- 48.- Hoff GL, Nichols JB. Canine brucellosis in Florida: Serologic survey of pound dogs. Animal Shelter workers and veterinarians. Am J Epidemiol 1974; 100:35-39.
- 49.- House C, Badakhsh FF. Slide test for *Brucella canis* (letter). JAVMA 1974; 165: 1046.
- 50.- Medveczky NE, Crichton R. The application of a serologic test to screen dogs entering Australia for antibody to *Brucella canis*. Aust Vet J 1986; 63:375-377.
- 51.- Miranda AQ, Colman OLR, Mancebo OA, Monzón CM. Detección serológica de anticuerpos anti *Brucella canis* en perros y humanos en el oeste de Formosa. Vet. Arg 1986; III:158-162.
- 52.- Moguel PA. Utilización de las pruebas: contraelectroforesis, fijación de complemento, de aglutinación rápida en placa, de aglutinación lenta en tubo y de factor inhibidor de la migración de los macrófagos, para detectar anticuerpos o células sensibilizadas contra *Brucella canis* en un grupo de perros sin dueño en el D.F. (tesis). México (DF). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnia, Universidad Nacional Autónoma de México. México, 1984.

- 53.- Myers DM, Varela-Díaz VM. Serological and bacteriological detection of *Brucella canis* infection of stray in Moreno, Argentina. *Cornell Vet* 1980; 70:258-265.
- 54.- Nicoletti PL, Mahler JR, Scarratt WK. Study of agglutinins to *Brucella abortus*, *Brucella canis* and *Actinobacillus equuli* in horses. *Eq Vet J* 1982; 14 :302-304.
- 55.- Patten BE. Antibodies to *Brucella canis* in dogs in Papua New Guinea. *Aus Vet J* 1987; 63:355.
- 56.- Pue HL, Gordon JC, Bech-Neelsen S. Detection of antibodies against *Brucella canis* in dogs. *Small Animal Modern Vet Pract* 1986; 612-614.
- 57.- Saegusa J, Ueda K, Goto Y, Fuyiwara K. A Survey of *Brucella canis* infection in Dogs from Tokyo Area. *Jap J Vet. Sci* 1978; 40:75-80.
- 58.- Wada T, Handa S, Mohri S. Serological Survey on Agglutinins to *Brucella canis* in Dogs of the Kyushu District. *Jap J Vet Sci* 1979; 41:339-341.
- 59.- Wooley RE, Brown J, Shotts EB, Blue JL. Serosurvey of *Brucella canis* antibodies in urban and rural stray dogs in Georgia. *Vet Med/Small Animal Clin* 1977; 1581-1584.
- 60.- Carmichael LE, Zoha SJ, Flores CR. Biological properties and dog response to a variant (M-) strain of *Brucella canis*. *Dev Biol Stand* 1984; 56:649-656.
- 61.- Carmichel LE, Joubert JC. A rapid slide agglutination test for the serodiagnosis of *Brucella canis* infection that employs a variant (M-) organism as antigen. *Cornell Vet* 1987; 77: 3-12.
- 62.- Zoha SJ, Carmichael LE. Serological responses of dogs to cell wall and internal antigens of *Brucella canis* (*B. canis*). *Vet Microbiol* 1982; 7:35-50.
- 63.- Zoha SJ, Carmichael LE. Properties of cell wall antigens of virulent *Brucella canis* and a less mucoid variant of reduced pathogenicity. *Am J Vet Res* 1982; 43:171-174.
- 64.- Flores CR, Carmichael LE. Canine brucellosis: Current status of methods for diagnosis. *Cornell Vet* 1978; 68:76-88.
- 65.- Mateu-de-Antonio EM, Martin M, Casal J. Comparasion of serologic tests used in canine brucellosis diagnosis. *J Vet Diagn Invest* 1994; 6:257-259.
- 66.- Gómez JM, Villalba EJ, Pasamontes B, Gasca A. Utilización de la técnica de E.L.I.S.A. para detectar anticuerpos frente a *Brucella canis* en sueros caninos. *Med. Vet* 1990; 7:531-534.

- 67.- Mateu-de-Antonio EM, Martin M, Soler M. Use of indirect enzyme-linked immunosorbent assay with hot saline solution extracts of a variant (M-) strain of *Brucella canis* for diagnosis of brucellosis in dogs. *Am J Vet Res* 1993; 54:1043-1046.
- 68.- Srikawa T, Iwaki S, Mori M, Muraguchi T, Yamada J. Purification of a *Brucella canis* cell wall antigen by using immunosorbent columns and use of the antigen in enzyme-linked immunosorbent assay for specific diagnosis of canine brucellosis. *J Clin Microbiol* 1989; 27:837-842.
- 69.- George LW, Carmichael LE. A plate agglutination test for the rapid diagnosis of canine brucellosis. *Am J Vet Res* 1974; 35:905-909.
- 70.- George LW, Carmichael LE. Development of a rose bengal stained plate-test antigen for the rapid diagnosis of *Brucella canis* infection. *Cornell Vet* 1978; 68:529-543.
- 71.- Rodríguez SMC. Estandarización de un antígeno de *Brucella canis* M- para el diagnóstico de Brucelosis canina por medio de la prueba de aglutinación en placa. (tesis) México (DF): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 1999
- 72.- Creek N. *Brucella canis* in dogs. *Iowa St Vet* 1980; 3:122-124.