



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

PRESENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA *Brucella* spp EN LOBOS MARINOS (*Zalophus californianus californianus*) EN EL GOLFO DE CALIFORNIA, MÉXICO

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
Rodrigo Mena Bañuelos

Asesores:

MVZ. Edgar Alfonseca Silva

MVZ. Juan A. Montaña Hirose

MVZ. Karina Acevedo Whitehouse

México D.F.,

2002



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

PAGINACIÓN
DISCONTINUA

DEDICATORIA

A mis padres por el gran apoyo que siempre me han dado a lo largo de estos años

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Rodrigo Mena

Basuñales

FECHA: 3/ diciembre/2002

FIRMA: 

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores Mc. Edgar Alfonseca Silva, Dr. Juan A. Montaña Hirose y Mc. Karina Acevedo Whitehouse. Por el apoyo que me han dado, por sus enseñanzas y su paciencia.

Al Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Al personal del Departamento de Microbiología e Inmunología por las facilidades que me brindaron en la fase experimental.

A los miembros del jurado Dr. Gustavo A. García Delgado, Dr. José A. Gutiérrez Pabello, Dr. Fernando Gual Sill, Dr. Carlos González Rebeles Islas. Por sus consejos, sugerencias y observaciones.

MVZ Adriana Reyes Guerra. Gracias por tu ayuda y tus consejos. Además de la gran paciencia que tienes.

Le agradezco al Dr. Evaristo Alvaro Barragán Hernández. Por sus observaciones y sugerencias epidemiológicas.

Le agradezco al Lic. Agustín Montaña por su apoyo y paciencia en el análisis estadístico.

Los sueros empleados en esta tesis fueron obtenidos por el financiamiento de CONACYT, proyecto 26430-N, bajo los permisos de SEMARNAP DOO750.-4172/97 Y DOO750.-4443/98.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
MATERIAL Y MÉTODOS	27
RESULTADOS	33
DISCUSIÓN	35
LITERATURA CITADA	47
FIGURAS	55
CUADROS	59
APÉNDICE	64

RESUMEN

MENA BAÑUELOS, RODRIGO. PRESENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA *Brucella* spp. EN LOBOS MARINOS (*Zalophus californianus californianus*) EN EL GOLFO DE CALIFORNIA, MÉXICO (bajo la dirección de: Edgar Alfonseca Silva, Juan A. Montaña Hirose y Karina Acevedo Whitehouse).

RESUMEN

En los últimos años se ha reportado la evidencia de anticuerpos contra *Brucella* spp. en mamíferos marinos. En este trabajo se estudió un banco de 220 sueros de lobos marinos (*Zalophus californianus californianus*) que habitan las islas del Golfo de California, México. Los sueros se evaluaron a través de tres pruebas serológicas para el diagnóstico de brucelosis. Se utilizó la prueba de tarjeta al 3 y al 8 % y un inmunoensayo enzimático indirecto en todos los sueros; la prueba de fijación del complemento se aplicó solamente a los sueros que resultaron positivos a las pruebas de tarjeta. Los resultados obtenidos fueron: 14 reacciones positivas (6% del total las muestras) a la prueba de tarjeta al 3%, 9 reacciones positivas (4%) en la prueba de tarjeta al 8%, en la prueba de fijación del complemento se encontraron 6 sueros positivos (2%) con diferentes títulos, en la ELISA- i 18 densidades ópticas (A_{405}) positivas (8% del total de las muestras), y solamente 5 sueros se pueden interpretar como positivos a las 4 pruebas aplicadas. Los resultados obtenidos indican la

evidencia de anticuerpos contra *Brucella* spp en la población de lobos marinos del Golfo de California, siendo este el primer estudio en México que reporta la posible infección por bacterias de este género en mamíferos marinos mexicanos. El porcentaje de las muestras positivas indican que hay una frecuencia de 8% de positividad en la población estudiada. Para el estudio de la brucelosis en lobos marinos se sugiere el uso de la prueba de tarjeta al 3% como tamiz y pruebas de ELISA como confirmatoria. Son necesarios los estudios de las poblaciones de mamíferos marinos y su relación con esta enfermedad, con el fin de poder evaluar el riesgo que esta bacteria representa para el ser humano y otras especies animales, y así poder conocer su epizootiología, impacto en la dinámica de poblaciones, y además poder definir la especie de *Brucella* que afecta al lobo marino del Golfo de California.

INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad infecciosa causada por bacterias del género *Brucella*. Las sinonimias con las que se le ha conocido incluyen aborto contagioso, aborto epizoótico, aborto infeccioso, enfermedad de Bang, fiebre de Malta, fiebre del Mediterráneo, melitococcia, fiebre ondulante y septicemia de Bruce. Actualmente se le conoce como brucelosis independientemente del estado de la enfermedad, especie o sexo en la que se desarrolla.^{1,2,3}

En la infección generalmente hay una bacteremia en la primera etapa, que puede evolucionar a un estado subagudo o crónico produciendo alteraciones de carácter inflamatorio y necrótico en el aparato reproductor. Por lo tanto, se manifiesta en problemas reproductivos como abortos y retención placentaria en la mayoría de las especies. En los machos ovinos, caprinos y caninos puede producir epididimitis u orquitis; produce esterilidad en machos y hembras, y baja la producción de leche de los hatos. Como consecuencia de lo anterior interrumpe programas de mejoramiento genético o de cruzamiento, por lo que es de gran importancia económica.^{3,4,5,6} La brucelosis tiene distribución mundial y es un problema de salud pública. Es considerada como una zoonosis clásica.^{1,2,7,8,9,10} Afecta a una gran variedad de especies de animales domésticos y silvestres, incluso se sabe que microorganismo convive con especies de mamíferos marinos, ya que en los últimos años, se ha estudiado una bacteria que se ha propuesto como *Brucella maris* con base a sus características fisiológicas y genéticas.^{5,6,7,8,11,12}

Historia de la brucelosis.

Probablemente la brucelosis se conoce desde la época de Hipócrates (400 a.c). Cleghorn realizó las primeras descripciones clínicas en 1751. Durante la Guerra de Crimea (1854-1856), se observaron varios casos de fiebres prolongadas en humanos. Estas fiebres fueron muy diferentes a las que se conocían en aquella época. El mayor número de enfermos se observó en la isla de Malta. En 1859, Marston realizó estudios sobre las fiebres del Mediterráneo y en 1863 describió la presentación de la enfermedad en Malta. Posteriormente, otros médicos describieron la enfermedad en otras regiones del Mediterráneo.^{1,13}

En 1886-1887, Bruce aisló e identificó el agente causal de la fiebre de Malta a partir del bazo de un soldado que murió de brucelosis. A la bacteria la llamó *Micrococcus melitensis* (*Brucella melitensis*).^{3,9,14,15,16,17} Bang y Stribolt (1896) aislaron el agente etiológico de la enfermedad conocida como aborto contagioso a partir de abortos en bovinos y lo denominaron *Bacillus abortus infectiosi* (*B. abortus*). Posteriormente este agente recibió el nombre de bacilo de Bang y éste sería el segundo miembro del género.^{3,9,15,16,18} En 1897 Huges presentó una de las descripciones más completas de la enfermedad. En ese mismo año, Wright y Semple desarrollaron una técnica para el diagnóstico basada en la propiedad aglutinante del suero.¹ Casi veinte años después del primer aislamiento se determinó la forma de contagio al ser humano, gracias a los estudios de Zammit que trabajó con anticuerpos aglutinantes en cabras, así como por los trabajos de Horrocks, quien aisló a la bacteria a partir de leche y orina de cabras.^{1,3} En 1911, Schroeder, Cotton, Molher y Traum aislaron el bacilo a partir de la leche de vaca y de las amígdalas de niños que consumieron esta leche.¹ Evans (1917-1918) demostró que existe una relación entre *Micrococcus melitensis* y el bacilo de Bang. De esta forma se estableció la presencia de la brucelosis en América.^{1,3,9,13,15}

Hutyra (1909) y Traum (1914) notificaron el aislamiento de la bacteria a partir de fetos de cerdos abortados. Traum propuso que este bacilo fuera considerado como una tercera especie del género. En el mismo año se sospechó que el bacilo también podría llegar a infectar a los caballos, lo que fue propuesto por un veterinario militar de nombre Ibars. Diez años después Keefer demostró la infección en seres humanos.^{3,13,15,16,18} En 1920 Feusier, Meyer y Shaw propusieron agrupar estas bacterias en un solo género bacteriológico y llamarlo *Brucella*, en honor a Bruce. Además, propusieron denominar estas bacterias como *Brucella melitensis* y *B. abortus*. En 1928 Huddleson propuso que se uniera a este género *B. suis*.^{3,17} Posteriormente, en Nueva Zelanda y Australia, Buddle y Boyes (1953) descubrieron que *B. ovis* da origen a abortos en ovejas y epididimitis en carneros. Otra especie identificada fue *B. neotomae* que fue aislada por Stoenner y Lackman en 1957 a partir de ratas del desierto. *B. canis* fue descrita por Carmichael y Bruner en 1968; esta bacteria es la causa de abortos en perros.^{16,18}

La historia de la brucelosis en México empieza con Carbajal (1906), quien fue el primero en sospechar la presencia de esta bacteria en nuestro país. En 1912, en el estado de Querétaro, Reséndiz relaciona los casos de fiebre recurrente en humanos con la importación de cabras de España. En 1921 Vergara aísla por primera vez *M. melitensis* (*B. melitensis*) y expone su trabajo en el VI Congreso Médico Nacional. Pláceres (1923) confirma este aislamiento y lo amplía con estudios bacteriológicos y serológicos. Cabe mencionar a Maximiliano Ruiz Castañeda que fue otro de los investigadores de la época, quien dedicó gran parte de sus investigaciones al diagnóstico, tratamiento, epidemiología y patogenia de la brucelosis.¹

En el último decenio del siglo XX se aisló una *Brucella* de mamíferos marinos en las costas de Escocia (Ross *et al.*, 1994). Esta bacteria posee varias características del género pero no es igual a las especies de *Brucella* ya conocidas. De hecho, se ha propuesto que sea una nueva especie y que lleve el nombre de *Brucella maris* (Jahans *et al.*, 1997). La propuesta se basa en las características específicas de esta bacteria, que son: requerimientos variables de CO₂, por presentar actividad metabólica sobre la galactosa, por el tipo de antígeno dominante y por el tipo de animal hospedero.^{11,19,20, 21}

Características del género *Brucella*.

En este género bacteriano se reconocen seis especies, cuatro de ellas se conocen como cepas lisas o cepas clásicas, que son: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* y *B. neotomae*. La primera afecta principalmente a cabras, la segunda a ganado bovino, la tercera al ganado porcino y la última se encuentra en roedores del desierto. Las otras dos especies se conocen como cepas rugosas, que son: *B. ovis* que afecta a ganado ovino y *B. canis* que afecta a perros principalmente. En los últimos años se ha llamado *Brucella maris* a la bacteria que se aisló de mamíferos marinos.^{1,2,7,15,22,23} Actualmente hay una propuesta sobre la clasificación de estas especies. Dado que hay una elevada homología entre este género de bacterias, se ha propuesto que el género parta de la especie *B. melitensis* y las demás especies tengan la categoría taxonómica de biovariedades, ejemplificando, *B. abortus* sería biovar *abortus* de *B. melitensis*. Independientemente del resultado de esta propuesta se debe tener claro que cada una de las actuales especies tiene hábitats característicos y hay ligeras diferencias entre cada una de ellas.²²

Morfológicamente son bacilos, cocobacilos pequeños o incluso se pueden ver como cocos, estos varían de tamaño de $0.5 - 0.7 \times 0.6 - 1.5 \mu\text{m}$, de tinción Gram negativa, no son móviles, no tienen flagelos y no producen esporas. En tinciones pueden observarse solos o agrupados en pares, cadenas cortas o en grupos pequeños.^{6,7,15,24,25,26} Macroscópicamente las colonias se desarrollan en 2 a 5 días. Las colonias clásicas son redondas, convexas, enteras, lisas, lustrosas o brillantes y translúcidas. Las colonias recientes miden de 1 a 2 mm de diámetro y si se dejan en incubación pueden crecer hasta 5 a 8 mm de diámetro.^{7,15,25,26,27} Taxonómicamente el género *Brucella* se clasifica dentro de la clase *Proteobacteria* subdivisión $\alpha 2$ y comparte esta división con otros patógenos intracelulares como *Rickettsia*.²²

Las estructuras que conforman este género son muy importantes. La envoltura celular tiene características muy específicas. Las propiedades de la pared hacen que se tiña como Gram negativa. La pared está formada por una membrana citoplasmática, una membrana externa y un espacio periplasmático intermedio. Este espacio contiene enzimas que desintoxican agentes nocivos del medio, proteínas relacionadas con el transporte de nutrientes, enzimas que actúan sobre los antibióticos β -lactámicos y un gel glucopéptido (mureína y peptidoglucano) importante en la actividad osmótica.²²

La membrana externa de *Brucella* contiene fosfolípidos, proteínas y un lipopolisacárido (LPS), pero es muy diferente a la de otras bacterias Gram negativas (como *Enterobacterias* y *Pseudomonas*) que comparten un modelo descrito de la envoltura celular. Una de las características que difieren a las brucelas de este modelo de envoltura, es que tienen, entre otros fosfolípidos, fosfatidil-colina, lo que es poco común entre otros patógenos Gram negativos. Estas y otras características la hacen muy permeable a agentes hidrófobos como los colorantes, detergentes y sales biliares. Sin embargo, es resistente a los péptidos

catiónicos bactericidas presentes en lisosomas y fluidos corporales (lisozima, lactoferrina, defensinas).²²

El LPS de esta bacteria al igual que el de otras Gram negativas, consta de varias fracciones: de la parte externa a la interna de la membrana está formado por una cadena llamada "O", que a su vez está compuesta de N-formil-perosamida; después tiene una fracción llamada núcleo, formada de diferentes azúcares; y la fracción que está más cerca de la membrana, que es conocida como lípido "A", que está compuesto por dos aminoazúcares unidos a un ácido graso. La cadena "O" la poseen de forma natural las especies llamadas lisas (LPS-S) pero pueden perderla naturalmente. Por otra parte, las cepas rugosas (LPS-R) carecen de la cadena "O". El LPS en fase "liso" es un factor importante para la respuesta serológica y patogénica en los animales. Otra estructura importante es un polisacárido denominado hapteno nativo y químicamente es similar al polisacárido (N-formil-perosamida) de la cadena "O"; el hapteno nativo está insertado en la cadena "O" de LPS. Se cree que su función biológica tal vez sea la de conferirle la característica de fase lisa a las bacterias con LPS-S.^{13,15,22}

El LPS (cadena "O") que posee *Brucella* es termoestable y se le han asignado letras según su composición, en cada especie varia el porcentaje que poseen de cadena "O". Las cepas lisas clásicas (*B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis*) poseen dos antígenos de superficie (epitopos) llamados "A" y "M". *B. abortus* y *B. suis* contienen más antígeno "A", aunque *B. suis* tiene una distribución más homogénea. Por otro lado, *B. melitensis* contiene más antígeno "M". Hay un epitopo que es denominado "C" y este se considera común entre las especies de *B. abortus* y *B. melitensis*. La diferencia entre los tipos de antígeno depende del enlace α que tengan los azúcares en la cadena "O" y de la cantidad de estos azúcares. *B.*

ovis y *B canis* no tienen antígeno "A" ni "M", pero tienen un antígeno llamado "R", aunque estas dos especies no son antigénicamente iguales. Estas propiedades se utilizan para aglutinación de sueros.^{7,13,15,22}

Otras estructuras importantes son las proteínas de membrana externa, que se pueden dividir en:

1. Las proteínas de 88-94 Kd de peso molecular probablemente participan en la síntesis de la envoltura.
2. Las proteínas de peso molecular entre 36-84 Kd son equivalentes a las porinas de otras bacterias Gram negativas. En este grupo se encuentran las proteínas llamadas *omp2a* y *omp2b* (nombre que se les asigna por el gen que las codifica).
3. Las proteínas de peso molecular entre 25-31 Kd tienen relación estrecha con el LPS, aunque su función se desconoce. En este grupo encontramos la *omp31* y *omp25*.²²

Las lipoproteínas son otros componentes de la pared celular. Existen varias de bajo peso molecular (*omp16*, *omp10*, *omp19*), las cuales se cree que inducen una respuesta serológica, pero significativamente menor que el LPS-S.²²

La estructura hidrófoba de la pared celular es muy importante para el crecimiento o desarrollo *in vitro* de *Brucella*. Por esta razón, no crece en medios selectivos (Mc Conkey). *Brucella* crece en medios primarios especiales con adición de proteínas de origen animal, como agar suero dextrosa (Farrell) o enriquecidos con triptosa, papa, infusión de hígado, sangre, glicerol, eritritol y suero a diferentes porcentajes que van de 2 a 7%. Generalmente crece todavía mejor en medios adicionados con aminoácidos (asparagina, histidina), minerales (magnesio y amonio) y vitaminas (tiamina, biotina, nicotinamida, ácido pantoténico). El crecimiento de la bacteria se puede mejorar aún más si se adiciona factor X (hemina) y el

factor V (nicotinamida adenin dinucleótido), pero estos factores de crecimiento no son esenciales. Lo anterior se explica porque estas bacterias tienen una baja capacidad sintética y por esta razón son bacterias nutricionalmente exigentes, ésta es una característica de todo el género. El rango de temperatura para el desarrollo de las colonias es de 20 a 40°C y el punto óptimo de temperatura es de 37°C. El rango de pH que necesitan estas bacterias es de 6.6 a 7.4.^{7,22,24,25,26,27}

Todas las especies de *Brucella* son aerobias, aunque algunas necesitan una presión mayor de CO₂ (5 al 10%), con diferencias entre los biotipos para el requerimiento de este gas. Poseen la enzima citocromo oxidasa como sistema de transporte en la respiración y tienen la capacidad de reducir nitratos.^{7,22,24,25,26,27} El metabolismo de estas bacterias es de tipo oxidativo y no fermentador, por lo tanto no producen gas a partir de la fermentación. *B. abortus* y *B. melitensis* no poseen glucólisis clásica y oxidan los azúcares por una vía afin a las pentosas, aunque hay algunas variaciones de oxidación entre los biotipos. *Brucella* no produce ácido a partir de carbohidratos en medios peptónicos convencionales, a excepción de *B. neotomae*. Algunos sustratos como lactato o glutamato también son oxidados. Son microorganismos carboxifílicos (afinidad por ácidos orgánicos), positivos a catalasa y ureasa, no producen indol, no licúan la gelatina, no coagulan el suero, no producen acetil metil carbinol y son rojo de metilo negativo. Algunos biotipos de las cepas lisas producen ácido sulfhídrico en diferentes cantidades. Algunos otros son susceptibles a colorantes como la fucsina y tionina, que generalmente se diluyen en medios de cultivo a las siguientes concentraciones: 1: 100,000, 1: 50,000 y 1: 25,000.^{6,7,22,24,25} El cristal violeta, la acriflavina y la pironina tienen el mismo efecto que la fucsina; otros colorantes que se han empleado son el azul A y safranina O.¹³

Los aislamientos bacteriológicos que se han realizado a partir de mamíferos marinos tienen características comunes del género *Brucella*. No producen H₂S, hidrolizan la urea, el requerimiento de CO₂ varía y crecen en fucsina básica, tionina y safranina. Estas bacterias se desarrollan con 10% de CO₂, generalmente como colonias pequeñas. La respuesta a la D-galactosa, D-eritrol y urocanato varía entre los aislamientos.²⁰ *B. maris* no es lisada por el fago R-C pero si por el fago Bk2 y por Iz. Algunas cepas son lisadas por el fago Fi y Xe.²⁰ Esta especie aglutina con suero anti-A y algunas cepas lo hacen con suero anti-M. No se han aislado cepas que aglutinen con suero anti-R ni con 0.1% de acriflavina.²⁰

Por las características antes mencionadas el género *Brucella* se encuentra dividido en especies, y éstos a su vez en biotipos o biovariedades. Los biotipos se basan en sensibilidad a colorantes, características bioquímicas, características serológicas y susceptibilidad a lisis por medio de fagos.^{2,7,15}

B. melitensis se divide en tres biotipos (1-3), *B. abortus* tiene ocho biotipos (1-9, el 8 se suprimió), *B. suis* se divide en cuatro (1-4)^{2,7,22,23,24}. Se ha propuesto que *B. maris* se divida en tres biotipos.^{11,20}

Para la caracterización genética del género *Brucella* se han utilizado diversas técnicas. Una de ellas es la hibridación de ADN – ADN. Esta técnica ayudó a clasificar o confirmar la clasificación de las especies o cepas en lisas (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* y *B. neotomae*) y rugosas (*B. ovis* y *B. canis*). Estos estudios indican que el género *Brucella* se origina de una genespecie simple, *B. melitensis*.²²

La homología de las secuencias de nucleótidos (ADN) de las cepas lisas es casi del 100% a comparación de las cepas rugosas, por ejemplo, *B. ovis* se asemeja en 94%.^{1,10,22} El ADN de este género contiene aproximadamente 58 a 59% de G - C (guanina - citosina). El

tamaño total del genoma es de 3.2×10^6 pares de bases aproximadamente. Dos características genéticas de importancia son que posee dos cromosomas circulares en la mayoría de las especies y hasta el momento se sabe que carece de plásmidos.^{1,22,23,26}

También las cepas marinas han sido caracterizadas genéticamente. Por técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se encontró que la secuencia del gen *rrs* tiene una homología mayor al 99.5% comparada con una cepa de referencia de la FAO/WHO; (Organización para la Alimentación y la Agricultura / Organización Mundial de la Salud), también se compararon marcadores específicos (genes) para proteínas de membrana (*Omp25*, *Omp31* y *Omp2b*) donde se demostró que hay una gran homología entre ambas.²¹ Por otro lado, la diversidad del género *Brucella*, estudiada por la técnica de electroforesis enzimática, de los loci múltiples, indica en estudios de todas las especies conocidas de *Brucella* incluyendo la aislada de mamíferos marinos, una gran diversidad genética. Estos estudios muestran la misma restricción genética de ARNr y muestran tipos de ribosomas idénticos, además muestran cromosomas similares.²⁷ El polimorfismo para el gen *bp26* presenta la secuencia de inserción *is711*. Esta secuencia se encuentra muy marcada en cepas aisladas de mamíferos marinos de diferentes zonas geográficas.²⁸ La digestión de genomas de *Brucella* por medio de electroforesis en gel de agarosa, con *XbaI* resulta en marcadores genéticos que consisten en 24 a 35 fragmentos de restricción y alcanzan un tamaño de 10,350 Kb. El análisis de electroforesis en gel para el ADN digerido de *Brucella* con *XbaI* revela cepas diferentes en los marcadores genómicos. Las únicas diferencias de la electroforesis son discernibles entre algunas cepas de *Brucella* y algunas cepas de mamíferos marinos. Las huellas genómicas aisladas de mamíferos marinos son diferentes de las reconocidas para las cepas terrestres de *Brucella*.²⁹ El análisis fenotípico ha demostrado que el gen *16S* ARNr de

B. maris es idéntico a algunas especies terrestres del género *Brucella*, en especial a *B. abortus*.³⁰

Epidemiología.

La brucelosis es una de las enfermedades que se mantienen como una de las zoonosis más prevalentes en el mundo. La infección en los humanos depende de la prevalencia en las poblaciones de animales domésticos y/o silvestres. En algunas áreas, *B. melitensis* y *B. suis* comienzan a aparecer como causas de infección en ganado bovino, lo que aumenta las posibilidades de infectar al ser humano. La brucelosis está incluida en la lista B de enfermedades de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE). Esta lista incluye enfermedades transmisibles importantes desde el punto de vista económico, social y/o sanitario. La notificación obligatoria es una disposición básica para la implantación de medidas zoonositarias.^{2,31}

La OIE clasifica los países y territorios en tres categorías. La categoría *A* incluye aquellos que están libres de la enfermedad por no haberse comprobado nunca o aquellos donde se eliminó la enfermedad. La categoría *B* incluye aquellos donde se sospecha de la enfermedad sin confirmación definitiva, casos excepcionales, o aquellos que tienen un control establecido y avanzado en la eliminación de la enfermedad. La categoría *C* incluye aquellos países o territorios donde la frecuencia notificada puede variar desde esporádica hasta elevada, ser localizada o extendida, o aquellos donde la enfermedad existe pero se desconoce la prevalencia o no se tiene información para valorar la prevalencia. México se encuentra en la categoría B de la lista de la Oficina Internacional de Epizootias.³¹

Los países que presentan mayor incidencia en brucelosis en América son Argentina, México y Perú. Lo mismo sucede en los países que están rodeando el mar Mediterráneo, Irán, sudeste de Rusia y Mongolia.² La brucelosis bovina ha sido eliminada de Finlandia, Noruega, Suecia, Dinamarca, Países Bajos, Bélgica, Suiza, Alemania, Hungría, República Checa, Rumania y Bulgaria.²

El biotipo 1 está presente en casi todo el mundo. En América Latina se ha comprobado la presencia de los biotipos 1, 2, 3 y 4. El biotipo 5 se ha encontrado en Inglaterra y Alemania.²

Los bovinos también pueden infectarse con otras cepas además de *B. abortus*, como *B. melitensis* y *B. suis*.² La brucelosis afecta especialmente a animales sexualmente maduros. Los terneros nacidos de hembras reactivas son serológicamente positivos debido a los anticuerpos presentes en el calostro y posteriormente son serológicamente negativos, aun cuando pueda haber una infección latente.^{4,8}

La brucelosis porcina es causada principalmente por *B. suis*. El problema principal son los abortos y la orquitis. Es poco frecuente en gran parte del continente europeo, Asia y Oceanía. Canadá está libre de brucelosis. En América Latina sólo se ha encontrado el biotipo 1, en EUA el 3 y en Europa el 2.^{2,4}

La prevalencia de *B. melitensis* es alta en México, Perú y Argentina. La brucelosis caprina y ovina es un problema importante en la cuenca mediterránea de Europa y África, y en el sudeste de Rusia, Mongolia y medio Oriente. La epididimitis del carnero está ampliamente difundida y ha sido comprobada en África, Europa, Nueva Zelanda y Australia. En América está presente en Brasil, Argentina, Chile, Perú, Uruguay y EUA.² En caprinos se presenta *B. melitensis* con sus tres biotipos en casi todo el mundo y el principal problema son

los abortos. En los ovinos se presentan abortos que también pueden ser causados por *B. melitensis* a parte de *B. ovis*, que también produce abortos en ovejas y orquitis en carneros.^{2,4}

En equinos la brucelosis se manifiesta con bursitis fistulosa y abortos. A partir de los equinos se ha aislado *B. abortus* y *B. suis*.²

La *Brucella* en perros ha sido notificada en casi todos los países. Esta especie es afectada por *B. canis*. Se ha comprobado su presencia en México, EUA, Brasil y Argentina. Los felinos son resistentes a la brucelosis.²

La brucelosis en animales terrestres de vida silvestre se ha notificado en venado cola blanca, cobayo, búfalo, bisonte, zorro, ciervo, gamo, jabalí, wapiti, reno, hiena moteada, perro salvaje, chacal negro, lobo, oso grizzly, oso negro, cerdo feral, zorra roja, mapache, lobo siberiano, zorra del Artico, coyote, tejón, mofeta, lince, chacal dorso negro, zarigüeya, caribú y ciervo.^{12,32, 33}

Se sabe que los mamíferos marinos pueden ser afectados o pueden ser portadores de 40 géneros bacterianos aproximadamente. Los más importantes que destacan por su potencial zoonóticos, son: *Brucella* spp, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Leptospira interrogans*, *Mycobacterium marinum*, *Mycoplasma* spp y *Salmonella* spp^{11,34}

En 1994 se reportó por primera vez la evidencia de *Brucella* en mamíferos marinos (Ross *et al.*, 1994). Después de la primera comunicación de *Brucella* en mamíferos marinos en las costas de Escocia se inició el estudio de los mismos en zonas geográficas similares. Las investigaciones realizadas se pueden dividir geográficamente en las del Continente Europeo y las del Continente Americano. Los registros de brucelosis en mamíferos marinos europeos (Ross *et al.*, 1996; Foster *et al.*, 1996; Jepson *et al.*, 1997) provienen principalmente de las

costas del Reino Unido y de las que se encuentran en el mar noruego y el mar de Barrets en el norte del océano Atlántico (Clavareau *et al.*, 1998; Trayland *et al.*, 1999).

Por otro lado, en el continente Americano se han estudiado mamíferos marinos en diferentes zonas geográficas, principalmente en el norte. Los dos primeros registros se realizaron en California (Ewalt *et al.*, 1994) y en una isla del estado de Washington (Garner *et al.*, 1997) en EUA. En el océano Atlántico se realizó otro estudio (Forbes *et al.*, 2000) en la isla de Magdalen situada en el golfo St. Laurence en la provincia de Quebec. Uno más se realizó al sur del continente (Retamal *et al.*, 2000) en las islas de Livinstong al sur de Chile. ^{35,36,37,38,39,40,41,42}

Se ha buscado la presencia de bacteria del género *Brucella* o sus anticuerpos en varias especies de mamíferos marinos. Esto incluye 14 especies de cetáceos (orden Cetacea, suborden Mysticeti) y 9 especies de pinípedos (orden Carnivora, suborden Pinnipedia) Se ha aislado la bacteria o evidenciado sus anticuerpos en las familias de las ballenas (Balaenopteridae), de los delfines (Delphinidae) y de las marsopas (Phocoenidae). En cuanto a los pinípedos, se han reportado en las familias de los lobos marinos (Otariidae) y de las focas (Phocidae). La brucelosis también se ha encontrado en una nutria de río (*Lutra lutra*) en el Reino Unido, ésta pertenece a otra familia de carnívoros (Mustelidae). ^{35,36,37,38,39,40,41,42}

Patogenicidad y presentación de la enfermedad.

En los humanos, los signos clínicos y síntomas son: fatiga, fiebre, insomnio, dolores vagales (dolores en los que no se puede determinar el sitio anatómico), malestar, frío, sudoración excesiva, dolor muscular, dolor de cabeza y anorexia. La fiebre puede alcanzar 40°C y declina rápidamente con repetidas recaídas por varias semanas. En hemogramas se

observa linfocitosis y leucopenia. El estado agudo termina en meses y el individuo puede eliminar al microorganismo (con antibióticos) satisfactoriamente aunque puede quedar con algunas lesiones. Algunas infecciones se pueden presentar en forma subaguda y terminan en un lapso de 10 meses. Las infecciones crónicas pueden tener cursos de un año con estados febriles periódicos, dolor muscular y fatiga.^{2,10,17,18,43,44} La invasividad y virulencia dependen mucho del animal hospedero y sus condiciones de salud.¹⁷

Generalmente las bacterias del género *Brucella* entran por abrasiones del epitelio de piel y mucosas. Las primeras defensas fagocíticas son los granulocitos neutrófilos polimorfonucleares que, junto con los macrófagos, tratan de controlar la infección localmente. Cuando falla esta primera defensa, los microorganismos entran por vía linfática hasta los linfonodos donde son fagocitados por los neutrófilos y macrófagos.^{17,18,44} Si la bacteria sobrevive esta segunda respuesta, se interna a la circulación sanguínea, donde puede ser fagocitada por los neutrófilos y llevada a los diferentes tejidos y órganos (hígado, bazo y médula espinal). Cuando los neutrófilos son desintegrados, las bacterias viables son liberadas y éstas pueden dar otro ciclo de infección.^{17,18} Estos microorganismos tienen afinidad por el tracto reproductivo del macho y la hembra. En la hembra, hay una afinidad especial por la placenta y el feto, en particular por los trofoblastos alantoideos, lo que ha sido correlacionado con la presencia de eritritol. En la hembra, también hay afinidad por la glándula mamaria.^{18,44}

El género *Brucella* ataca principalmente al sistema mononuclear fagocítico o retículo endotelial. Los microorganismos atraen a los macrófagos y proliferan en ellos, siendo las cepas lisas más resistentes a la muerte intracelular que las cepas rugosas.^{18,44,45} Los macrófagos infectados producen pequeños granulomas. Conforme crecen, se desarrolla una

necrosis caseosa en el centro de los granulomas. Se observa un gran número de neutrófilos que rodean la lesión y que tejido conectivo fibroso rodea la periferia del granuloma.¹⁸

La especie *B. abortus* es menos invasiva y la infección generalmente es moderada, con poca destrucción tisular.¹⁷ Las vacas presentan infecciones uterinas que se manifiestan con abortos, nacimiento de becerros débiles y retención de placenta. La bacteria infecta los linfonodos supramamarios y por ende los organismos son liberados en la secreción láctea. En los toros generalmente la infección pasa inadvertida. Los microorganismos pueden alojarse en los órganos genitales causando orquitis y epididimitis y pueden presentarse en el semen. Generalmente se considera que la transmisión venérea es rara. El microorganismo se encuentra en la porción fetal de la placenta, principalmente en el corion y fluidos fetales.^{18,43} Este viscerotropismo se da por la presencia de eritritol, el cual se considera como un factor de crecimiento de *B. abortus* y sólo se encuentra en cantidades considerables en la placenta de animales que son susceptibles a aborto infeccioso, pero no se encuentra en la de los humanos. *B. abortus* parece inhibir la degranulación de los neutrófilos y como consecuencia suprime su actividad antibacteriana. La brucelosis en bovinos también puede ser causada por *B. melitensis* y *B. suis*.^{8,43}

B. abortus puede infectar caballos, perros, borregos, rumiantes silvestres y al humano.¹⁸ En los bovinos, la transmisión se da por las descargas uterinas infectadas, fetos abortados y placentas.¹⁸ Las placentas de las vacas presentan necrosis de cotiledones y el espacio intercotiledonario se encuentra edematoso. Hay áreas amarillentas y necróticas en los cotiledones y en el resto del corion se aprecian lesiones opacas. Microscópicamente en las células coriónicas se aprecia un infiltrado inflamatorio con necrosis. Se observan macrófagos y neutrófilos. Pueden estar presentes células epitelioides. El feto abortado generalmente está

edematoso con fluido sanguinolento en las cavidades. Puede presentarse bronconeumonía, caracterizada por un infiltrado mononuclear y un número decreciente de neutrófilos. Los linfonodos fetales son hiperplásicos y el timo es más pequeño de lo normal.¹⁸

Los microorganismos proliferan en las mucosas usando interacciones hospederobacteria. Las bacterias son fagocitadas y dentro de los fagosomas resisten los péptidos lisosomales antibacterianos.^{44,45} Además, la *Brucella* evade los anticuerpos ya que es un parásito intracelular.^{46,47}

El periodo de incubación varía de una a seis semanas. La principal ruta de infección es por la leche o por el contacto de la piel con secreciones contaminadas. Los principales reservorios de la enfermedad son los caprinos, bovinos, equinos, suinos y ovinos. En el ganado infectado las placentas, fetos y descargas son infecciosos, así como la sangre y la orina.¹⁸

B. melitensis produce las infecciones más severas y su potencial de invasión es elevado.¹⁷ Los signos y el mecanismo de transmisión en los caprinos son muy similares a los que se presentan en el ganado bovino.^{8,18,43}

B. suis es altamente invasiva pero tiende a localizarse produciendo inflamación, necrosis y supuración.¹⁷ Tiende a cursar como una enfermedad crónica. Si se presenta bacteremia, la bacteria puede permanecer por varios meses sin localizarse en un órgano en especial. Los microorganismos pueden permanecer en el útero causando una metritis prolongada. La infección se caracteriza por abortos, altas tasas de mortalidad al parto, redrojos, lechones débiles, abscedación focal y espondilitis; la transmisión venérea también se considera rara.^{2,8,15,18,43}

B. canis generalmente se encuentra en perros que conviven con ganado aunque no se relaciona con las especies que afectan a estos últimos y raramente infecta al ser humano. La enfermedad es moderada y localizada con poco daño tisular.¹⁷ En hembras se caracteriza por abortos, infertilidad y prolongada bacteremia. La infección en los machos se caracteriza por epididimitis u orquitis.^{2,8,18,43} La transmisión en perros también se puede dar por descargas uterinas, fetos abortado y coito.¹⁸

No se sabe si *B. ovis* es patógena para el ser humano.¹⁷ El principal signo clínico en carneros es epididimitis acompañada de lesiones en la túnica vaginal y en el testículo. En las borregas se presentan abortos e inflamación de la placenta. Cuando hay productos vivos, son débiles y de bajo peso al nacer.^{8,18} No se sabe si *B. neotomae* es patógena para el ser humano.¹⁷

Diagnóstico.

Además del diagnóstico bacteriológico hay otras técnicas que se utilizan en diferentes especies animales. Las podemos dividir en serológicas y moleculares. Sólo las serológicas son recomendadas por la Norma Oficial Mexicana de la "Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales" (NOM 041-ZOO-1995); éstas son: prueba de tarjeta, rivanol, fijación del complemento y prueba de anillo de leche.⁴⁸

La fijación del complemento es una prueba diseñada para bovinos. La base de esta prueba consiste en una reacción de antígeno (cepas lisas) con anticuerpo y finalmente la unión con el complemento.^{7,49,50} La prueba es muy específica y sensible con sueros bovinos y su uso se ha extendido a todos los bóvidos, y a los caprinos y ovinos.^{48,49} La prueba de tarjeta se utiliza como prueba tamiz.^{7,48} Consiste en confrontar un suero sospechoso contra una

suspensión de *B. abortus* cepa 1119-3 a una concentración del 8 % (para diagnóstico de *B. abortus*) y 3 % (para diagnóstico de *B. melitensis*) y amortiguada a un pH de 3.5 ± 0.05 y teñido con rosa de Bengala.^{7,48,50,51} La técnica de Rivanol con colorante de acridina es similar a la prueba de tarjeta; se basa en inhibir la acción de las IgM (inducidas por la vacunación o en infecciones primarias) y dejar disponibles únicamente las IgG, antes de enfrentar el suero a un antígeno específico (*B. abortus*).^{2,7,50,52} La prueba de Bang utiliza un antígeno teñido y sirve para muestras de leche; se fundamenta en la unión Ag-Ac que forma una red que es empujada por la grasa de la leche y forma un anillo en su superficie; cuando no hay esta unión Ag-Ac el antígeno adicionado a la leche permanece homogéneo.^{7,53}

Recientemente, se han estado comercializando y utilizando de manera paralela las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Se ha utilizado generalmente como una prueba serológica donde se desea demostrar la presencia de anticuerpos. Para captarlos, se utilizan fragmentos de la bacteria (LPS, hapteno nativo o proteínas citoplasmáticas).^{54,55,56,57} Estas técnicas tienen una sensibilidad cercana al 100% cuando se utiliza hapteno nativo y LPS, y 96% con proteínas. La especificidad es 98% para el LPS y hapteno nativo, y para proteínas es 94%.⁵⁴

Se ha descrito una prueba de inmunodifusión radial en gel con hapteno nativo. En los pozos se coloca el suero sospechoso. Si algún suero presenta anticuerpos contra *Brucella*, se forma un anillo de precipitación después de un periodo de incubación.⁵⁸

La prueba de polarización de la fluorescencia es una prueba químico-física-serológica que demuestra la presencia de anticuerpos en suero. Es capaz de distinguir animales infectados de animales vacunados. Sin embargo, la prueba requiere de un espectrómetro de fluorescencia.⁵⁹ La prueba se fundamenta en unir anticuerpos específicos (muestras de distintas

especies) con conjugados de polisacáridos de la cadena "O" de LPS, estos conjugados contienen isotiocianato de fluoresceína que son moléculas que tienen una velocidad de rotación y emisión de luz polarizada de acuerdo con su tamaño, el cual aumenta al unirse con los anticuerpos. Al unirse los anticuerpos con el conjugado la velocidad de las moléculas y la luz emitida disminuyen, lo que puede ser medido con un detector de luz polarizada.⁵⁹

Actualmente se desarrollan pruebas moleculares para el diagnóstico de la brucelosis. La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se emplea para detectar fragmentos específicos de ADN de la bacteria sospechosa, el diagnóstico se puede hacer a partir de pequeñas cantidades de la muestra. Otra técnica que se puede realizar con el ADN bacteriano es el método de análisis del polimorfismo de longitud en fragmentos de restricción. Este método identifica secuencias específicas (del genoma de *Brucella*) de pares de bases y que están distribuidos a lo largo de la cadena de ADN.⁶⁰

En el caso de la brucelosis caprina además de las pruebas ya mencionadas, se puede usar la técnica de intradermorreacción. En ella se utilizan fragmentos proteicos de la pared celular como antígeno, que es inoculado en la piel para medir la reacción que hay sobre dicho antígeno.⁶¹

Para el diagnóstico de la brucelosis canina, puede usarse un método de aglutinación en placa. Se utiliza *B. canis* como antígeno (5%) y se tiñe con rosa de Bengala. En este método, similar al rivanol, se emplea 2-β-mercaptoetanol, para romper los puentes disulfuro de las IgM que se encuentran en el suero en las fases tempranas de la infección, dejando en evidencia la aglutinación producida por las IgG.⁶²

Para diagnosticar *B. ovis* en ovinos se ha utilizado la prueba fijación del complemento, inmunoensayos enzimáticos, inmunodifusión doble en gel, rosa de Bengala,

hemoaglutinación, inmunofluorescencia y rivanol. Sin embargo las pruebas serológicas más recomendadas por su sensibilidad y especificidad son: inmunodifusión doble gel, fijación del complemento y los inmunoensayos enzimáticos. La prueba de inmunodifusión doble gel donde se emplea antígeno proteínico específico de *B. ovis* parece ser la más confiable para el diagnóstico de *B. ovis*.^{48,63}

En los humanos pueden emplearse la mayoría de las técnicas ya mencionadas para el diagnóstico de brucelosis en animales. Otras pruebas que se emplean en humanos son la de seroaglutinación (SAT) y la de Coombs. La prueba de SAT mide el nivel de anticuerpos aglutinantes y la prueba de Coombs pone en evidencia los anticuerpos no aglutinantes (IgA e IgG).⁶⁴

En mamíferos marinos se ha utilizado la bacteriología convencional para lograr los aislamientos y la identificación de la bacteria. Se han utilizado la mayoría de las técnicas estandarizadas o modificaciones de ellas para evidenciar la presencia anticuerpos contra *Brucella* en mamíferos marinos.^{35,36,37,38,39,40,41,42}

Jepson *et al.*, (1997) utilizó un inmunoensayo indirecto y uno competitivo con *B. melitensis* como antígeno de captura y proteína A conjugada a la peroxidasa. El autor concluyó que estas dos pruebas tienen una correlación similar y que el inmunoensayo competitivo es de fácil ejecución a comparación con el indirecto. Trayland *et al.*, (1999) utilizó un inmunoensayo indirecto con LPS de *B. abortus* y proteína G conjugada con peroxidasa para monitorear una serie de sueros. Una vez que identificó los sueros positivos, los probó con aglutinación, aglutinación modificada con EDTA y fijación del complemento. Lamentablemente el autor no hace mención de la positividad por prueba y solamente reporta un porcentaje final independientemente de la prueba utilizada. Ross *et al.*, (1996) aplicó la

prueba de rosa de Bengala, aglutinación y un ensayo inmunoenzimático indirecto con *B. abortus* como antígeno de captura. La prueba que mostró un mayor porcentaje de positividad fue rosa de Bengala, seguida del ensayo inmunoenzimático indirecto y aglutinación. Retamal *et al.*, (2000) empleó rosa de Bengala, inmunodifusión en agar, fijación del complemento y un ensayo inmunoenzimático competitivo con proteína G conjugada a la peroxidasa. Esta última fue la más sensible, seguida de fijación del complemento y rosa de Bengala. La prueba de inmunodifusión en agar no mostró ninguna reacción positiva y el número de resultados anticomplementarios en la prueba de fijación del complemento fue elevado (62%). Garner *et al.*, (1997) en la isla de Bainbridge, Washington (EUA), reportó la presencia de esta bacteria en una foca (*Phoca vitulina richardsi*) de vida libre. Esta investigación incluyó pruebas por medio de serología (prueba de aglutinación en placa con antígeno amortiguado, prueba de tarjeta y fijación del complemento), bacteriología, histopatología e inmunohistoquímica. En cortes histológicos teñidos con Giemsa se observaron cocobacilos en el tracto uterino de *Parafilaroides* y *Otostrongylus*. Corroborando que eran cocobacilos Gram negativos, se orientó el trabajo para la búsqueda de *Brucella*. Posteriormente se aisló *Brucella* de linfonodos sublinguales, mesentéricos, subclaviculares, supraclaviculares y del hígado de la foca. En los pulmones también se aisló *Brucella*, pero fue más abundante el cultivo a comparación de los aislamientos logrados de otros tejidos probablemente debido a su asociación con los parásitos pulmonares. El autor sugiere que la patogenia de la brucelosis en focas se asocia a nemátodos pulmonares que se alojan en algunas secciones de bronquios y bronquiolos.^{35,36,37,38,39,40,41,42}

En relación al potencial de zoonosis Brew *et al.*, (1999) notifica la exposición de una persona que realizaba estudios con *Brucella* previamente aisladas de mamíferos marinos, que

enfermó y se diagnosticó con diferentes pruebas como serología, técnicas moleculares y se confirmó con el aislamiento de *Brucella*. Este microorganismo tenía las mismas características de un aislamiento previo de *Brucella* proveniente de mamíferos marinos con el que se había trabajado. Los síntomas y signos que presentó esta persona fueron continuos dolores de cabeza, pérdida de peso y sinusitis severa. Los análisis serológicos fueron positivos a IgM e IgG por medio de ELISA- c y aglutinación. Para el aislamiento bacteriológico, se inocularon muestras de sangre heparinizadas en medio Ruiz Castañeda y se incubaron a 37° C con humidificación y 10% de CO₂. Seis semanas después aparecieron colonias parecidas a *Brucella*, que fueron sembradas en tubos con suero dextrosa agar y en agar Farrell e incubadas a 37° C. Después de tres días, se identificó el biotipo de las colonias por métodos convencionales y PCR, determinando que correspondía a la nueva especie del género *Brucella*, propuesta como *B. maris*. Lo anterior sugiere que este microorganismo es potencialmente infeccioso para el ser humano.⁶⁵

Control y profilaxis.

México cuenta con la Norma Oficial Mexicana NOM 041-ZOO-1995 “Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales”. Esta norma tiene como objetivo el control y erradicación de la brucelosis en los animales domésticos. En esta norma se unifican los procedimientos, actividades, criterios, estrategias y técnicas a seguir para el control y la eliminación de esta enfermedad en todo el territorio nacional. Los animales que contempla esta norma son bovinos, caprinos, ovino y porcinos.⁴⁸

Justificación.

Hace falta estudiar la brucelosis en diferentes especies de mamíferos, para conocer mejor su epidemiología. Evaluar un mayor número de especies e individuos, tanto terrestres como marinos, que indiquen la presencia de este microorganismo en las poblaciones y poder conocer mejor la distribución geográfica de esta bacteria; así mismo es necesario estudiar la patogenia y los mecanismos de transmisión en mamíferos marinos. Así mismo, poder evaluar los riesgos a la salud humana y otras poblaciones animales (terrestres o marinas) de vida silvestre o domésticas. Sólo así se conocerá si los mamíferos marinos preservan o diseminan la enfermedad y las posibles repercusiones en humanos con actividades relacionadas con estos animales.

Hipótesis:

Los lobos marinos (*Zalophus californianus californianus*) del Golfo de California presentan inmunoglobulinas contra *Brucella* spp. Que pueden ser demostradas con técnicas diagnósticas comúnmente utilizadas en mamíferos domésticos.

Objetivo general:

Evidenciar la presencia de anticuerpos contra *Brucella* spp en lobos marinos del Golfo de California, usando tres técnicas de diagnóstico comúnmente utilizadas en mamíferos domésticos.

Objetivos específicos:

Evidenciar la presencia de anticuerpos contra *Brucella* por medio de la prueba de tarjeta con una concentración de antígeno de 3%, en una suspensión amortiguada a un pH de 3.5 ± 0.05 .

Evidenciar la presencia de anticuerpos contra *Brucella* por medio de la prueba de tarjeta con una concentración de antígeno de 8%, en una suspensión amortiguada a un pH de 3.5 ± 0.05 .

Evidenciar la presencia de anticuerpos contra *Brucella* por medio de la prueba de fijación del complemento.

Estandarizar un inmunoensayo enzimático indirecto para la detección de inmunoglobulinas contra *Brucella* en lobos marinos.

Determinar el tipo de proteína (proteína A o proteína G) que tenga mayor afinidad sobre isotipos IgG de lobos marinos en un inmunoensayo enzimático.

MATERIAL Y MÉTODOS**Especie**

Los lobos marinos que se estudiaron en este trabajo pertenecen a la Orden Carnivora, Suborden Pinnipedia, Familia Otrariidae y especie *Zalophus californianus californianus*.

Obtención de los sueros

En este trabajo se utilizaron 220 sueros que se colectaron en un proyecto de investigación anterior.¹ Las muestras de sangre se tomaron de 220 crías diferentes de lobos

¹ CONACYT 26430-N

marinos capturadas en las loberas.⁵ El sangrado fue por la vena yugular con aguja de 38 mm del número 18. Las muestras se tomaron con sistema vacutainer sin anticoagulante. Después de formado el coágulo, las muestras fueron conservadas en refrigeración a la sombra. La misma noche, a bordo del navío, los sueros fueron clarificados por centrifugación y congelados a -5°C . Las muestras se trasladaron en hielo seco al Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM para diferentes estudios.

El muestreo en lobos marinos fue realizado únicamente en la región geográfica clasificada como uno que corresponde a la península de Baja California (zonas de distribución geográfica de mamíferos marinos en América del Norte [Figura 1]).⁶⁶ Los lobos marinos del estudio habitan las siguientes loberas: Los Islotes, Consag, San Jorge, San Esteban, San Pedro Mártir, Isla Granito, Los Machos, El Rasito, El Partido, Isla Lobos. La distribución geográfica de las loberas se muestra en la Figura 2. Además se obtuvo un suero control positivo a *Brucella* de lobo marino, que fue proporcionado por la MVZ Karina Acevedo Whitehouse, proveniente de Marine Mammal Center EUA.

Técnicas diagnósticas.

Brucella maris es una nueva especie, que reacciona como una especie lisa. Por lo tanto, en este estudio se utilizaron dos pruebas estandarizadas para el diagnóstico de *Brucella* (cepas lisas) y un inmunoensayo indirecto enfocado al diagnóstico de LPS liso de *Brucella*.^{7,55,56,67,68}

⁵ Permiso SEMARNAP DOO750.-4172/97 y DOO 750.-4443/98.

1. Prueba de tarjeta.

La primera prueba que se aplicó fue la de aglutinación en tarjeta o rosa de Bengala^a. Se utilizó la técnica de Alton *et al.*, (1988) en todas las muestras, con antígeno de *Brucella abortus* cepa 1119-3 al 3% y al 8%, teñido con rosa de Bengala, con un pH de 3.65 ± 0.05 .^{7,50,51}

El antígeno y los sueros (incluyendo el testigo positivo) se colocaron a temperatura ambiente durante 30 minutos aproximadamente. Se depositaron 30 μ l de suero en una placa limpia de vidrio con divisiones (4x4 cm), empleando una micropipeta.^b Al lado se depositó otra gota de 30 μ l del antígeno al 3% y se mezclaron manualmente el suero y el antígeno, con movimientos giratorios, utilizando un agitador nuevo desechable de madera. Después se dieron movimientos rotatorios a la placa y se esperó de tres a cuatro minutos para hacer la lectura de la prueba. Ésta se realizó con una fuente de luz apropiada (foco de 60 W). El suero testigo positivo, que siempre se colocó en una división superior de la placa de vidrio, aglutinó fuertemente al antígeno.

El criterio de evaluación de los resultados fue el siguiente:

- Negativo (-). Cuando la mezcla de suero y antígeno tuvo un color rosado uniforme sin ningún grado de aglutinación (grumos) ni formación de ceja.
- Positivo (+). Cuando la mezcla de suero y antígeno presentó cualquier grado de aglutinación (grumos) o formación de ceja.

^a PRONABIVE, México DF

^b Micropipeta Pipetman- Rainin US.

Dado que esta técnica es una prueba tamiz, cualquier grado de aglutinación fue considerado positivo. El mismo procedimiento se repitió en todos los sueros con antígeno al 8%.

2. Fijación del complemento.

Los sueros que dieron reacción positiva a la prueba tamiz (rosa de Bengala) fueron confrontados a la prueba de fijación de complemento, que es una prueba confirmatoria, según descrita por Alton *et al.*, en 1988.^{7,49,50} A continuación se describe brevemente la técnica.

Se utilizaron microplacas con 96 pozos con fondo en "U" para diluir el suero (1:4) inactivado, el cual se distribuyó en otra placa, depositando 25 µl por pozo. Se distribuyeron 25 µl de solución de cloruro de sodio amortiguada con barbital (veronal, SAV). Se mezclaron las dos soluciones y se realizaron diluciones seriadas de los sueros con pipeta multicanal.

Se agregaron 25 µl de antígeno 1:200 de *B. abortus* y posteriormente 25 µl de complemento. Se agitó la placa para mezclar los reactivos y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Se adicionaron 25 µl de sistema hemolítico y se incubó nuevamente a 37°C durante 30 minutos, con agitación de la placa a los 15 minutos. La placa se retiró del baño de maría y se centrifugó a 2,000 rpm durante 5 minutos. La lectura se realizó visualmente con la ayuda de un espejo lector y se interpretó de la siguiente manera:

- Positiva (++++) cuando el sobrenadante se vio incoloro, con un botón bien definido.
- Positiva (++++) cuando el sobrenadante presentó 25% de hemólisis.
- Positiva (++) cuando el sobrenadante presentó 50% de hemólisis.
- Positiva (+) cuando el sobrenadante presentó 75% de hemólisis.
- Negativa cuando se vio 100% de hemólisis en el sobrenadante, sin botón.

- Anticomplementaria cuando el sobrenadante presento hemólisis parcial y sedimentación de glóbulos rojos.

3. Inmunoensayo indirecto (ELISA-i).

Como última prueba se utilizó un inmunoensayo indirecto.^{7,54,55,56,57,67,68} En éste se incluyeron todos los sueros obtenidos de lobos marinos. Para la estandarización del inmunoensayo indirecto se utilizaron inmunoplasmas (Maxi Sorp Surface de Nunc Inmuno Plate[©]) de 96 pozos con fondo plano. Las soluciones se prepararon conforme se describe en el apéndice.

Las placas fueron sensibilizadas con 2.5 µg/100 µl/pozo de LPS liso de *Brucella melitensis* 16M, en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Las placas fueron cubiertas con plástico autoadherible para evitar la deshidratación y la contaminación con partículas de polvo, y se incubaron durante toda la noche a 37°C.

En la mañana siguiente, se vaciaron las placas por aspiración y se lavaron cuatro veces con 200 µl de PBS y una vez con PBS-T (PBS adicionado de Tween 80)^d. Las placas se sacudieron manualmente volteándolas y golpeándolas firmemente contra una superficie sólida con papel absorbente. Después del secado, se bloquearon las placas con una solución (100 µl por pozo) de albúmina sérica bovina al 1%, durante una hora en un agitador orbital^e. Al término de ésta se lavaron con una solución PBS-T tres veces con 200 µl/pozo y se secaron de la manera antes descrita. Para la conservación de las placas se cubrieron con plástico autoadherible y se guardaron en refrigeración a 4°C hasta su uso.^{57,67}

[©] Nunc-Immuno Plate Denmark.

^d Bio- Rad 1250 ImmunoWash UK.

^e Agitador orbital Bellco 7744-00110 US.

Se realizaron diluciones dobles seriadas de los sueros con PBS, desde 1/50 hasta 1/800 en un volumen final de 100 μ l, incluyendo un suero testigo positivo y uno negativo. Después de diluir los sueros, las placas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente, en agitación orbital a 130 rpm, cubiertas con bolsas de plástico de poliuretano. Al término de la incubación se aspiró el suero diluido y las placas se lavaron tres veces con 200 μ l de PBS-T y se secaron como anteriormente se describió.

Los conjugados de proteína A^f o G^f con peroxidasa fueron preparados en PBS-T. Se adicionó 100 μ l/pozo de uno u otro conjugado a una dilución de 1/400 y la placa se incubó durante una hora a temperatura ambiente, en un agitador orbital a 130 rpm. Se aspiró el conjugado y se lavó tres veces con PBS-T a un volumen de 200 μ l con una máquina lavadora de placas y se secó manualmente conforme descrito.

El cromógeno se preparó con ABTS,^f marca comercial de la sal diamonio del ácido 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzthiazoline-sulfónico), a razón de 5 mg (una tableta) diluidos en 50 ml de citrato de sodio amortiguado a pH 5 (solución A). El sustrato (solución B) se preparó con una dilución de agua oxigenada (30%) a razón de 5 μ l en 120 μ l de agua destilada. La preparación final se realizó mezclando 10 ml de la solución A con 10 μ l de la solución B. La mezcla se realizó durante el último periodo de incubación, en frasco ámbar y protegida de la luz con papel de aluminio, ya que es sensible a la luz. Se adicionaron 100 μ l/pozo de la mezcla de sustrato y cromógeno y se incubó durante una hora a temperatura ambiente en la oscuridad. La densidad óptica se determinó con un espectrofotómetro Multiscan^h a 405 (A_{405}) nanómetros (nm).^{7,55,56,57,67,68}

^f SIGMA US.

^h Bio- Rad 3550 UK.

Análisis de resultados

Para las pruebas de rosa de Bengala y fijación del complemento se calculó el porcentaje de positividad.

En el inmunoensayo enzimático indirecto se aplicó la prueba de medias pareadas para diferenciar los resultados de las D.O. entre las dos proteínas conjugadas con peroxidasa que se probaron.¹

Para el inmunoensayo enzimático indirecto se determinó el punto de corte que es la suma de 2 desviaciones estándar (controles negativos) al promedio de los sueros controles negativos (n=10). Una vez determinado el punto de corte se identificaron los sueros positivos y se obtuvo el porcentaje de animales positivos dentro de la muestra.^{55,56,68}

Una vez identificados los sueros positivos por las diferentes técnicas y para distinguir si hay alguna relación entre los resultados de cada prueba diagnóstica, se calculó la concordancia o conformidad entre el inmunoensayo enzimático contra las demás pruebas por medio del valor de Kappa.¹

RESULTADOS

Resultados de las pruebas diagnósticas aplicadas a sueros de lobos marinos

Hubo 6% de reacciones positivas (14/220) en los sueros que se trabajaron con la prueba de tarjeta al 3%. En la prueba de tarjeta al 8% hubo 9 sueros positivos, lo que representa el 4% del total de sueros. En la prueba de fijación del complemento se encontraron 6 sueros positivos (3%) con diferentes títulos. Dos sueros fueron anticomplementarios

¹ Statistical Package for Social Sciences

¹ Win Episcopo 2.0

Al aplicar la ELISA- i en los sueros de lobos marinos se encontró 18 D.O. positivas, lo que da un porcentaje (8%). En la Cuadro 1 se comparan los porcentajes de sueros positivos con las tres técnicas. En la Figura 3 se muestra la gráfica de todas las D.O. (A_{405}) de los sueros de lobos marinos y el punto de corte.

La concordancia entre las pruebas fue la siguiente. Para la prueba de tarjeta al 3% y ELISA el valor de Kappa (K) fue de 0.6; para tarjeta al 8% y ELISA $K=0.33$ (Cuadro 2 y 3).

Resultados de la estandarización del inmunoensayo

Se evaluaron los posibles sueros testigos con diluciones dobles seriadas desde 1/50 hasta 1/800 que se realizaron con multipipeta.^k Los sueros que se incluyeron en esta placa fueron: positivos (humano, bovino infectado naturalmente, bovino vacunado con RB51, caprino, lobo marino) y negativos (humano, bovino, lobo marino). Estos sueros habían resultado positivos o negativos a brucelosis por otras pruebas antes mencionadas.

En los sueros se compararon dos receptores de baja afinidad de la fracción cristalizable de las IgG (Fc γ RIII): proteína A de *Staphylococcus aureus* y proteína G de *Streptococcus* spp en sueros de lobos marinos. La proteína A reconoce fuertemente a las IgG humanas. Por otra parte, la proteína G reconoce mejor a las IgG de rumiantes. Inicialmente, se probaron ambas proteínas a 1/400 con sueros de especies terrestres y de lobos marinos.⁶⁹

Se observó que la afinidad de la proteína A por la IgG de los lobos marinos fue mayor que la de la proteína G (sin embargo presentó 5.1% de probabilidad de que se parezcan los resultados de proteína A y G por la prueba estadística de diferencia de medias con t de Student). Además de su mayor afinidad por las IgG de los lobos marinos, la proteína A no interactúa con la región Fab como lo hace la proteína G, lo que permite una mejor

^k Pipetman Finnipipette US.

formación de complejos proteína A, Anticuerpos y Antígenos. La lectura se realizó a los 30 y 60 minutos de incubación con el sustrato – cromógeno a 405 nm. Se obtuvieron densidades ópticas (A_{405}) más fáciles de diferenciar a los 60 minutos. Con base en los resultados se escogieron el suero humano positivo y un suero de lobo marino para usarse como testigos positivos.

Una vez seleccionados los sueros testigos y la proteína A conjugada con peroxidasa se ensayaron tres diluciones de proteína A conjugada con peroxidasa para determinar la dilución final que se utilizara con los sueros de lobos marinos: 1/250, 1/500 y 1/1000. A la par también se evaluó la dilución del suero pero a menor concentración: 1/25, 1/50 y 1/100.

La densidad óptica (D.O.) fue mayor en la dilución 1/250 de proteína A y 1/25 de suero con 60 minutos de incubación. Finalmente se decidió utilizar una concentración de 1/200 de proteína A y una concentración de suero 1/20 para la prueba. Los sueros se trabajaron en forma pareada.

Los resultados de la D.O. se muestran en la Cuadro 4 y 5, el diseño que se utilizó para aplicar el inmunoensayo indirecto a los sueros de lobos marinos se esquematiza en la Figura 4.

DISCUSIÓN

América del norte se divide en 6 zonas geográficas de distribución de mamíferos marinos.⁶⁶ Se han realizado estudios sobre la brucelosis en estos animales en las regiones dos y cinco. La región 2 corresponde al océano Pacífico que rodea a Alaska, Canadá y Estados Unidos de América y la región 5 corresponde al océano Atlántico que rodea el sur de Canadá y a Estados Unidos de América.^{35,40,42,66} El presente trabajo se realizó en la región 1, que

corresponde al océano Pacífico que rodea a México, y se limita a animales presentes en el golfo de California, área geográfica delimitada por la península de Baja California y los estados de Sonora y Sinaloa. Ésta área es de clima tropical y difiere mucho en condiciones climáticas a las zonas geográficas donde se han realizados los otros trabajos, además es una zona donde no se habían realizado estudios sobre brucelosis en mamíferos marinos. Todavía falta conocer si los mamíferos marinos de las regiones tres, cuatro y seis de América del norte cohabitan con bacterias del género *Brucella*.

Tomando en cuenta los estudios que se han realizado en otras partes del mundo, parece ser que los mamíferos marinos de diferentes continentes, océanos y mares están en contacto con la bacteria o lo han estado en alguna etapa de sus vidas. Hasta hoy la evidencia mostró que esta bacteria se encuentra en ambos círculos polares y regiones cercanas a estos, principalmente, los territorios de países americanos y europeos donde se han realizado estudios, además el presente trabajo muestra que también se encuentra en regiones cálidas cercanas al trópico, como las que pose el territorio mexicano. Sería muy interesante saber la distribución de la brucelosis en mamíferos marinos en otros continentes, para poder conocer si realmente es un microorganismo que está adaptado a distintas especies acuáticas de diferentes áreas geográficas. Con esta información se podría conocer un poco más sobre la evolución, adaptación y distribución de la *Brucella* en mamíferos marinos y terrestres.

19,20,21,32,33,35,36,37,40,42

Las muestras que se han recolectado para estudios de brucelosis en mamíferos marinos se pueden dividir en tres. La primera para estudios bacteriológicos (Ross *et al.*, 1994; Jahans *et al.*, 1997; Forbes *et al.*, 2000; Ewalt *et al.*, 1994; Foster *et al.*, 1996), la segunda para estudios serológicos (Jepson *et al.*, 1997; Tryland *et al.*, 1999; Ross *et al.*,

1996; Retamal *et al.*, 2000) y la tercera para estudios patológicos donde también se realizó bacteriología y serología (Garner *et al.*, 1997). Del primer tipo de muestreo han derivado trabajos de genética bacteriana. Hasta ahora, la mayoría de los estudios sobre brucelosis en mamíferos marinos se basaron en muestreos realizados a partir de cadáveres encontrados en las costas. Esto dio como resultado que en la literatura abunden las publicaciones referentes a muestreos variables de animales de diversas especies, géneros y familias, de varios días de muertos por diferentes causas, a diversas edades y en diferentes regiones vecinas a los círculos polares, a lo largo de varios meses o años.

Hasta ahora, los especímenes de donde se han tomado las muestras para los estudios provienen principalmente de animales muertos encontrados en las costas. Jepson *et al.*, (1997) además incluyó sueros de pinípedos vivos en centros de rehabilitación. Otros estudios se realizaron en mamíferos cazados para el comercio (Clavareau *et al.*, 1998 y Trayland *et al.*, 1999). Sólo Retamal *et al.*, (2000) obtuvo todas sus muestras a partir de pinípedos vivos.

En nuestro estudio las 220 muestras fueron tomadas de animales silvestres vivos de una sola especie de lobo marino que habita en las loberas de distintas islas del Golfo de California. En esta área geográfica no se había investigado la presencia de *Brucella* o de sus anticuerpos en este tipo de mamíferos. Y esta región es la única de clima tropical donde se haya investigado la presencia de anticuerpos contra *Brucella* spp. En la población de lobos marinos del Golfo de California (*Zalophus californianus californianus*) solamente se ha reportado la presencia de anticuerpos contra serovariedades de *Leptospira interrogans* (Godínez RC *et al.*, 1999).⁷⁰

Para este estudio se seleccionaron tres pruebas serológicas para el diagnóstico de brucelosis. Dos de ellas están estandarizadas para su uso en rumiantes domésticos y la tercera

se ha empleado comúnmente para el diagnóstico del microorganismo en diferentes especies animales.

Las pruebas de Tarjeta al 3% y 8% fueron de fácil ejecución en todos los sueros de lobos marinos y la interpretación de los sueros una vez aplicada la técnica se obtiene en pocos minutos. Esta técnica es de gran utilidad ya que los materiales que se utilizaron son mínimos y no presentaron ninguna complicación en este estudio. En este trabajo las pruebas de Tarjeta al 3% y 8% mostró diferencias dependientes de la concentración de antígeno: al 3% se encontraron 14 sueros positivos, mientras que al 8% sólo 9 ($n = 220$). Esta diferencia probablemente se debe al fenómeno de equivalencia entre la cantidad de antígenos (epitopos de A, C y M) de cepas lisas de *Brucella* y anticuerpos de lobos marinos. Por ejemplo, en el caso de brucelosis caprina la prueba de rosa de Bengala al 3% da resultados más confiables, ya que al disminuir la concentración de antígeno celular aumenta a la sensibilidad de dicha prueba. Este fenómeno de equivalencias también se presenta en mamíferos terrestres.^{12,62,71} Lamentablemente, en el caso de la prueba de rosa de Bengala ningún autor indicó el porcentaje de antígeno utilizado ya que este es diferente para diagnosticar brucelosis causado por dos especies distintas de *Brucella*, pero suponemos fue al 8% ya que es la que se utiliza de rutina en la mayoría de los países.

En la prueba de fijación del complemento se pensaba incluir en un principio todos los sueros de lobos marinos, pero en el primer lote que se probó, muchos sueros presentaban el fenómeno de anticomplementariedad que no permitió una adecuada lectura de los resultados. Finalmente solamente se aplicó esta técnica a los sueros que salieron positivos a las pruebas de Tarjeta al 3% y 8%, los resultados que se obtuvieron fueron 6 sueros positivos ($n=21$) lo que representa 2% de positividad. La prueba de fijación del complemento se considera como

la más específica para el diagnóstico de la brucelosis en bovinos. Aunque se ha aplicado a otros ruminantes domésticos, en los animales silvestres terrestres no se han obtenido resultados satisfactorios por presentar el fenómeno de sueros anticomplementarios.^{12,41}

El inmunoensayo enzimático indirecto se pensó como herramienta útil para evidenciar la presencia de anticuerpos. La técnica con la que se contaba estaba estandarizada con LPS liso de una cepa tipo *B. melitensis* 16M, para la captura de inmunoglobulinas anti-LPS liso de *Brucella* (Alfonseca *et al.*, 1998). Estudios anteriores (Ross *et al.*, 1996; Jepson *et al.*, 1997; Tryland *et al.*, 1999; Forbes *et al.*, 2000 y Retamal *et al.*, 2000) reportan resultados aceptables usando antígenos de *B. melitensis* y *B. abortus* para unir inmunoglobulinas séricas contra *Brucella* en mamíferos marinos, por lo cual parece ser que es indistinto el tipo de LPS liso de las diferentes especies de este género para ser usados en la captura de estos anticuerpos. Además las tres cepas consideradas como lisas (*B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*) son similares en el tipo de estructura química de LPS.^{13,15,22} Una parte importante en el desarrollo y estandarización del inmunoensayo es qué tipo de sueros controles (positivos y negativos) se utilizarían para aplicar en lobos marinos y qué tipo de molécula con inmunoespecificidad a IgG de lobos marinos se utilizaría, ya que el inmunoensayo enzimático estaba estandarizado para diagnóstico de brucelosis caprina. En este sentido se probaron varios sueros positivos a *Brucella* (humano, bovino infectado naturalmente, bovino vacunado con RB51, caprino, lobo marino) y negativos (humano, bovino, lobo marino) con diferentes proteínas capaces de unir IgG de diversas especies (proteína A y G para determinar cuál era la más adecuada para su uso con lobos marinos). Los Resultados de las D.O. de los mamíferos terrestres se podía suponer de antemano ya que se conoce que la proteína A reconoce fuertemente a las IgG humanas, por otra parte, la proteína G se une mejor a las IgG

de rumiantes, pero no había nada descrito de su uso en sueros de lobos marinos con los cuales no se había trabajado.^{69,72} En nuestro ensayo se pudo apreciar que existe mayor inmunofinidad entre inmunoglobulinas de lobos marinos con proteína A, esto se pudo apreciar por la diferencias de D.O. que se alcanzaron. Otros autores han comparado técnicas inmunoenzimáticas competitivas e indirectas conjugadas con proteínas A y han concluido que hay una buena correlación entre ambas técnicas utilizando esta proteína.³⁷

Al aplicar la ELISA-i en los 220 sueros de lobos marinos se identificaron 18 sueros (D.O) positivos lo cual representa el 8% de positividad. Además esta técnica diagnóstica resulta interesante, ya que se puede apreciar la evidencia epidemiológica, esto es los diferentes niveles de anticuerpos producidos por la exposición al microorganismo.

El punto de corte que se utilizó para diferenciar sueros positivos de los negativos en el inmunoensayos enzimáticos indirectos de este trabajo fue: la suma de dos desviaciones estándar al promedio de los controles negativos. Sin embargo cuando se utiliza este tipo de punto de corte siempre cabe la posibilidad de que se presenten falsos positivos entre dos y tres desviaciones estándar.^{54,55,68}

Para comparar los resultados se utilizó el método de Kappa, este método elimina la tendencia de un observador a dar consistentemente valores mayores a una prueba que a otra prueba, esto da como resultado la concordancia entre observadores u observaciones, es decir hasta qué punto los observadores u observaciones coinciden en su medición. Este método solamente lo aplicamos entre las pruebas de Tarjeta al 3%, al 8%, y ELISA-i, ya que son las únicas pruebas donde se incluyeron los 220 sueros de lobos marinos.

Las técnicas diagnósticas, tanto bacteriológicas, como genéticas y serológicas, generalmente fueron desarrolladas para aplicarse en las especies domésticas y no se conoce a

ciencia cierta su especificidad y sensibilidad para las especies de mamíferos terrestres o mamíferos marinos. Las técnicas han dado resultados positivos, pero no hay un método diagnóstico estandarizado que pueda servir de guía para aplicarse en animales de vida silvestre. Por ejemplo en este estudio y otro realizado por Retamal *et al.*, (2000), se presentó el mismo fenómeno de anticomplementariedad en la prueba de fijación del complemento. Lo cual sugiere que esta prueba no debería de tomarse como de primera elección.

La incidencia o la prevalencia de esta enfermedad varía entre los distintos reportes. Por ejemplo, Jepson *et al.*, (1997) encontró más sueros positivos con el inmunoensayo indirecto con una incidencia de 10% y 8% respectivamente en las dos especies de pinípedos. Tryland *et al.*, (1999) encontró que la incidencia varió en las tres especies de pinípedos estudiados y ésta fue de 35%, 10% y 2%. Ross *et al.*, (1996) basándose en la prueba que evidenció el mayor número de positivos, la incidencia que encontró fue de 49% y 32% en dos especies de pinípedos; en cetáceos reveló una incidencia de 28% y 100% (este último porcentaje fue de un solo animal muestreado). Por otro lado Retamal *et al.*, (2000) la incidencia fue de 100% en una sola especie de pinípedo ($n=1$) y de 44% en otra especie de pinípedo. Como se puede apreciar los resultados obtenidos varían entre especies y técnicas diagnósticas utilizadas. La aportación de este trabajo a la epidemiología de la brucelosis en lobos marinos es que se encontró una frecuencia de 8% en la zona estudiada; este resultado es comparable con algunos otros resultados.

La mayoría de estos reportes se han realizado a lo largo de varios años. En este trabajo, como es el primero, solamente se puede hablar de una frecuencia de positividad y sería un error hablar de incidencia y prevalencia por falta de estudios previos. Pero sería de gran importancia que se realizaran más muestreos para poder determinara estos datos

epidemiológicos y así poder conocer como es la dinámica de esta enfermedad en la población de lobos marinos. Esto es relevante ya que las poblaciones de lobos marinos y las loberas están definidas y se podría decir que no hay influencia externa como una migración de estos animales. Son pocos los países que han hecho estudios de brucelosis en especies silvestres, y menos los que han realizado estudios en especies acuáticas, además los reportes realizados no tienen una población definida en sus estudios.^{12,23,35,36,37,38,39,40}

Hay muchas interrogantes sobre la patogenia de esta especie del género *Brucella*, se sabe que distintas especies de mamíferos marinos conviven con la bacteria, pero no se sabe si esta afecta de algún modo a estos mamíferos. Por lo tanto se desconoce si puede tener un impacto en la salud de los mamíferos marinos.⁴² Por otro lado se ha reportado la posible relación de la transmisión de esta bacteria por medio de parásitos pulmonares (Garner *et al.*, 1997). Sería interesante saber si en otros estudios (Ross *et al.*, 1994; Ewalt *et al.*, 1994; Foster *et al.*, 1996; Ross *et al.*, 1996; Jepson *et al.*, 1997; Jahans *et al.*, 1997; Tryland *et al.*, 1999; Forbes *et al.*, 2000; Retamal *et al.*, 2000) que se han realizado se ha encontrado dichos parásitos u otros, ya que en la mayoría de estos reportes se han practicado necropsias a distintos mamíferos marinos. Valdría la pena conocer los ciclos de vida y la distribución de estos parásitos para poder hacer una relación más convincente con la *Brucella* que se aisló. Esta relación que se hace de los parásitos con *Brucella* rompe totalmente con los esquemas que se conocen acerca de los mecanismos de transmisión de las demás especies de este género.

Generalmente la brucelosis se asocia a problemas reproductivos en mamíferos terrestres pero no se sabe el papel que juega esta bacteria en mamíferos marinos. Aunque este se ha asociado a abortos en delfines (Ewalt DR *et al.*, 1994), pero aún se desconoce el

potencial patogénico. Si la característica de abortos que distingue a la brucelosis en mamíferos terrestres también se presenta en mamíferos marinos, resultaría un problema para la conservación de las especies en cautiverio.⁴¹

Con relación a la enfermedad, todavía hay muchas dudas que contestar. No se sabe si este miembro del género *Brucella* sobrevive en ambientes salinos. Se sabe que el microorganismo no sobrevive en medios con concentraciones elevadas de sales, y las condiciones de mar son adversas para la supervivencia y para que pudiese darse una contaminación indirecta o directa. Además no se conocen el tiempo de supervivencia en los mamíferos marinos ni los mecanismos de transmisión entre las poblaciones.

Con relación a los mecanismos de transmisión sería importante conocer cómo adquieren los individuos y las poblaciones dicha bacteria, saber si es por contacto con animales infectados o por vía placentaria o por los hábitos alimenticios o de convivencia.

Con relación al potencial como zoonosis, Brew *et al.*, (1999) notificó la infección con *Brucella* de un laboratorista que trabajaba con aislamientos de mamíferos marinos.⁶⁵ El autor concluyó que los individuos en contacto con cualquier mamífero marino, deben conocer el riesgo de contagio por esta zoonosis potencial. Otros autores también sugieren que la *Brucella* proveniente de mamíferos marinos puede ser potencialmente patógena para el ser humano bajo ciertas condiciones de laboratorios (aerosoles), lugares donde hay partos de estos animales y productos de mamíferos marinos. Ya que la brucelosis puede afectar al humano y en algunos casos puede ser por el contacto con estos animales (mucosas y piel). También sugieren que los mamíferos marinos pueden ser un reservorio más para los microorganismos que causan la brucelosis. Finalmente la mayoría de los autores sugieren mayor investigación sobre la genética, epidemiología, mecanismos de transmisión y

patogenicidad. Pero uno de los grandes problemas que enfrenta este tipo de investigaciones, resulta muy difícil saberlo en mamíferos marinos y más si son de vida silvestre.^{23,29,30,32,33,35,36,37,38,39,40,41}

En la población de mamíferos marinos en la que se concentró este estudio, se han realizado otros estudios encabezados por Aurioles GD (CICIMAR-IPN). Uno de estos estudios se enfocó en la búsqueda de anticuerpos contra serovariedades de *Leptospira interrogans* (Godínez CR *et al.*, 1999).⁷⁰ Sería interesante saber si hay alguna relación entre la leptospirosis y la brucelosis en esta misma población, así como descubrir el animal hospedero de estos agentes. Godínez *et al.*, 1999 sugieren que algunos portadores de esta enfermedad en la isla son roedores, gatos ferales y humanos (pescadores), por otro lado Acevedo WK estudia la posibilidad de transmisión por otros mamíferos con interrelación islas-continente, como serían los murciélagos.[†] Se desconoce si estos posibles portadores tienen algún tipo de relación con los mamíferos marinos. En cualquiera de las dos enfermedades sería interesante saber si hay relación con otros animales, donde pudiera haber contaminación y si es igual para otras enfermedades que pudieran padecer los lobos marinos del Golfo de California.

[†] Comunicación personal.

CONCLUSIONES

Este trabajo es el primer reporte que se refiere a la presencia de anticuerpos anti-*Brucella* en lobos marinos mexicanos. Esto sugiere el posible contacto con bacterias del género *Brucella*.

Las pruebas de tarjeta son rápidas y de fácil ejecución. Éstas son usadas generalmente como pruebas de tamiz en ganado. Los resultados obtenidos de las pruebas realizadas con sueros de lobos marinos, sugieren que la prueba de tarjeta 3% tiene mayor capacidad de aglutinar que la prueba al 8%, por lo que se recomienda su uso como prueba tamiz.

La prueba de fijación del complemento es muy usada en animales domésticos y en el humano. Sin embargo, los resultados de este trabajo sugieren que es una mala opción para el diagnóstico de anticuerpos en mamíferos marinos. Además, se observó que algunos sueros fueron anticomplementarios.

Se utilizó una ELISA-i con LPS de *Brucella melitensis* y proteína A conjugada a peroxidasa para inmunodetección de inmunoglobulinas de lobos marinos a una dilución de 1/200. La dilución óptima para el suero fue de 1/20. Se recomienda el uso de este inmunoensayo, utilizando proteína A, para evidenciar IgG de lobos marinos ya que esta técnica mostró mayor número de animales positivos. Con este método también se puede observar la respuesta de anticuerpos en las diferentes etapas de la infección si se realizan diferentes muestreos serológicos como es el caso de la ELISA-i.

Se obtuvieron reacciones positivas variables entre las técnicas que se aplicaron a los sueros. Esto indica que los lobos marinos del golfo de California tuvieron anticuerpos de clases IgM e IgG ya que las pruebas utilizadas son específicas para diagnosticarlos. Los

resultados sugieren que los mamíferos marinos estuvieron en contacto con *Brucella*, aunque se desconoce la especie.

Se encontró una frecuencia de 6% con la prueba de rosa de Bengala al 3%, 4% con la prueba de rosa de Bengala al 8%, 3% con la prueba de fijación del complemento y 8% con ELISA-i. Se observó una concordancia por el valor de Kappa (0.6), considerada como moderada a buena entre las pruebas de ELISA y Tarjeta al 3 %.

Es necesario aislar la bacteria para caracterizarla y al mismo tiempo estudiar la patogenia en los lobos marinos, principalmente para conocer el periodo de incubación y mecanismos de transmisión, patogenicidad y persistencia en el ambiente marino. Solamente así podremos saber su real impacto en la salud de mamíferos marinos.

LITERATURA CITADA

1. Suárez GF. Introducción. En: Díaz E, Hernández L, Valero G, Arellano B, editores. Diagnostico de Brucelosis Animal. México DF: SAGARPA-INIFAP, 2001 3-7.
2. Acha NP, Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2nd ed. E.U.A: OPS 1986.
3. Hutyra FV, Marek J, Manninger R. Patología y terapéutica especiales de los animales domésticos. Tomo I, 1^a ed. Barcelona: Labor. 1959.
4. Aiello SE, Mays A. El manual Merck de Veterinaria. 5^a ed. Barcelona: Océano, 2000.
5. Trigo TJF. Patología sistémica veterinaria. 3^a ed. México DF: McGraw-Hill Interamericana 1998.
6. Cottral GE. Manual de métodos estandarizados en microbiología veterinaria. Tomo I. México DF: Prensa Médica Mexicana SA, 1986.
7. Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. Techniques for the brucellosis laboratory. Paris, Francia: FAO / OMS INRA, 1988.
8. Blood DC, Radostits. Medicina Veterinaria. Tomo I. 7^a ed. México: McGraw-Hill Interamericana. 1992.
9. Ryser ET. Public health concerns. In: Elmertl M, Steele JL. Applied dairy microbiology. New York USA: Marcel Dekker Inc. 1998: 296-300
10. Moyer NP, Holcomb LA. *Brucella*. In: Murray PR, Baron EJO, Pfaller FC, Tenover FC, White
11. Higgins R. Bacterial and fungi of marine mammals: A review. Can Vet J 2000; 41:105-116.

12. Dieguez BE. Presencia de anticuerpos contra *Brucella* en los animales del Zoológico de Chapultepec de la Ciudad de México (tesis de licenciatura). México, D.F. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM, 1995.
13. Freeman BA. *Brucella*, fiebre ondulante; aborto contagioso del ganado. En: Burrows W. Tratado de microbiología. 20ª ed. México DF: Interamericana, 1974: 472-481.
14. Lansing PM, Harley JP, Donald KA. Microbiología. 4ª ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana 1999.
15. Carter GR, Chengapa MM. Bacteriología y micología veterinaria. 2ª ed. México: Manual Moderno 1994.
16. Wilson G, Miles A. Principles of bacteriology, virology and immunity. 6ª ed Vol I. Baltimore, USA: Williams & Wilkins Company 1975.
17. Boyd RF, Joseph JM. Medical microbiology. 1ª ed. Boston, USA: Little Brawn and Company 1980.
18. Carlyle TJ, Duncan RH, King NW. Veterinary pathology. 6ª ed. Baltimore, USA: Williams & Wilkins 1997.
19. Ross HM, Foster G, Reid RJ. *Brucella* species infection in sea mammals. Vet Rec 1994; 134: 359.
20. Jhans KL, Foster G, Broughton ES. The characterization of *Brucella* strains isolated from marine mammals. Vet Microbiology 1997; 57: 373-382.
21. Clavaeru C, Wellemans V, Walravens K, Tryland M, Verger JM, Grayon M, Cloeckaert A, Letesson JJ, Godfroid J. Phenotypic and molecular characterization of a *Brucella* strain isolated from minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*). Microbiology 1998; 144: 3267-3273.

22. Moriyon I, López GI. Estructura, genética y fisiología del género *Brucella*. En: Díaz E, Hernández L, Valero G, Arellano B editores. Diagnóstico de Brucelosis Animal. México: INIFAP, 2001: 17-29.
23. Corbel MJ. Brucellosis: an overview. *Emerging Infectious Diseases* 1997; 3: 213-221.
24. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Willams ST. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9^a ed. Philadelphia USA: Lippincott Williams & Wilkins 2000
25. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. *Microbiología medica*. 15^a ed. México DF: Manual Moderno 1995.
26. Corbel MJ, Brinley MJW. Genus *Brucella*. In: Krieg NR Holt JG. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol I. Baltimor, USA: Williams Wilkins 1984.
27. Gándara B, López MA, Rogel MA, Martínez RE. Limited genetic diversity of *Brucella* spp. *J Clinical Microbiol* 2001; 39: 235-240.
28. Cloeckaert A, Grayon M Grepinet O. An IS711 element downstream of bp26 gene is a specific of *Brucella* spp. Isolated from marine mammals. *Clinical and Diagnostic laboratory Immunology* 2000; 7: 835-839.
29. Jensen AE, Cheville NF, Thoen CO, Mac Millan AP, Miller G. Genomic fingerprinting and development of a dendograms for *Brucella* spp. Isolated from seals, porpoises, and dolphins. *J. Vet Diagn Invest* 1999; 11: 152-157.
30. Bricker BJ, Ewalt DR, Mac Millan AP, Foster Brew S. Molecular charecterization of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *J. of Clinical Microbiology* 2000; 38: 1258-1262.

31. Alvarez EP. Situación de la brucelosis en América: Panorama general. En: Díaz E, Hernández L, Valero G, Arellano B editores. Diagnóstico de Brucelosis Animal. México: INIFAP, 2001: 9-16.
32. Drew ML, Jessup DA, Burr AA, Franti CE. Serologic survey for brucellosis in feral swine, wild ruminants, and black bear of California. *Journal of Wildlife Diseases* 1992; 28: 355-363.
33. Tassaró SV. The existing and potential importance of brucellosis and tuberculosis in canadian wildlife: A review. *Can Vet J* 1986; 27: 119-123.
34. Dunn JL. Bacterial and mycotic diseases of cetaceans and pinnipedes. In: Dierauf LA editor. *Handbook of marine mammal medicine, health, disease and rehabilitation*. Boca Raton Florida: CRC press, 1990: 78-87.
35. Forbes LB, Nielsen O, Measures L, Ewalt DR. Brucellosis in ringed seals and harp seals from Canada. *Journal of Wildlife Diseases* 2000; 36: 595-598.
36. Trayland M, Kleivane L, Alfredsson A, Kjeld M, Arnason A, Stuen S, Godfroid J. Evidence of *Brucella* infection in marine mammals in the North Atlantic Ocean. *Vet Rec* 1999; 144: 588-592.
37. Jepson PD, Brew S, MacMillan AP, Baker JR, Barnett J, Kirkwood JK, Kuiken T, Robinson IR, Simposn VR. Antibodies to *Brucella* in marine mammals around the coast of England and Wales. *Vet Rec* 1997; 141: 512-515.
38. Ross HM, Jhans KL, Mac Millan AP Reid RJ, Thompson PM, Foster G. *Brucella* species infection in North Sea seal and cetacean population. *Vet Rec* 1996; 138: 647-648.
39. Foster G, Jahans KL, Reid RJ, Ross HM. Isolation of *Brucella* species from cetaceans, seals and an otter. *Vet Rec* 1996; 138: 583-586.

40. Ewalt DR, Payeur JB, Martin BM, Cummins DR, Miller WG. Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). J Vet Invest 1994; 6:448-452.
41. Retamal P, Blank O, Abalos P, Torres D. Detection of anti-*Brucella* antibodies in pinnipeds from the Antarctic territory. Vet Rec 2000; 146: 166-167.
42. Garner MM, Lambourn DM, Jeffries ST, Hall PB, Rhayan JC, Ewalt DR, Polzin LM, Chieville NF. Evidence of *Brucella* infection in *Parafilaroides* lungworms in Pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardsi*). J Vet Invest 1997; 9: 298-303.
43. Nicoletti P. *Brucella*. In: Carter GR, Cole JR, editors. Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology. 15^a ed. San Diego California: Academic Press Inc, 1990: 95-100.
44. Davis DB, Dulbecco R, Eisen HM, Ginsberg HS. Microbiology. 4^a ed. Washington: JB Lippincott Company 1990.
45. Alan KB. Bacterial evasion of host-derived antimicrobial peptides on mucosal surface. In Brogden KA editor. Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens. 3^a ed Washington DC: American Society Microbiology, 2000: 19-40.
46. Corbeil LB. Bacterial resistance to antibody-dependent defenses. In Brogden KA editor. Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens. 3^a ed Washington DC: American Society Microbiology, 2000: 1190-130
47. Volkwesley A. Basic microbiology. 4^a ed. USA: J.B. Lippincott Company 1980.
48. Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Norma Oficial Mexicana NOM - 041- ZOO - 1995 Campaña Nacional Contra la Brucelosis en los Animales. Diario Oficial de México (DF) 20 agosto 1996: 43-66.

49. Cobos MA, Peña FPG, Romero RC, Velázquez QF, Velázquez SMaM, Vicencio MMA, Villa SJJ, Luna MJE, Mateos PA, Betancourt MX. Fijación del complemento. En: Díaz E, Hernández L, Valero G, Arellano B editores. Diagnóstico de Brucelosis Animal. México: INIFAP, 2001: 56-79.
50. Valero EG. Diagnostico Veterinario. 1ª ed. México: CENID Microbiología, INIFAP, SARH, PAIEPEME, SMPV 1993.
51. Mancera MA. Prueba de antígeno brucelar amortiguado o de tarjeta. En: Díaz E, Hernández L, Valero G, Arellano B editores. Diagnóstico de Brucelosis Animal. México: INIFAP, 2001: 80-81.
52. Leal HM, Martínez MOL. Prueba de rivanol. En: Díaz E, Hernández L, Valero G, Arellano B editores. Diagnóstico de Brucelosis Animal. México: INIFAP, 2001: 82-86.
53. Mancera MA, Velázquez QF, Ontiveros CMDeL. Prueba de anillo en leche o anillo de Bang para el diagnóstico de Brucelosis en bovinos. En: Díaz E, Hernández L, Valero G, Arellano B editores. Diagnóstico de Brucelosis Animal. México: INIFAP, 2001: 87 -91
54. Bautista OM, Ochoa DV. Técnicas de inmunoensayo ligadas a enzimas. En: Díaz E, Hernández L, Valero G, Arellano B editores. Diagnóstico de Brucelosis Animal. México: INIFAP, 2001: 92- 95.
55. Sociedad Cubana de Microbiología Veterinaria. ELISA, La técnica inmunoenzimática Principios y Aplicación. La Habana: SCMV, 1990.
56. Peralta EL, Frias MT. Manual sobre la técnica inmunoenzimática ELISA, Principios y aplicación en la rama agropecuaria. La Habana Cuba: CENASA 1987.
57. Alfonseca SE. Diagnóstico diferencial de la brucelosis en rumiantes por medio de un inmunoensayo enzimático de tipo competitivo (ELISA-C). En: Díaz E, Hernández L,

- Valero G, Arellano B editores. Diagnóstico de Brucelosis Animal. México: INIFAP, 2001:96-99.
58. Hernandez AL, Días AE. Prueba de inmunodifusión radial con hapteno nativo para el diagnóstico de brucelosis. En: Díaz E, Hernández L, Valero G, Arellano B editores. Diagnóstico de Brucelosis Animal. México: INIFAP, 2001: 100-102
59. Nilsen K, Lin M, Gall D, Jolley M, Colmenares VG. Fundamentos y aplicaciones de la polarización de la fluorescencia. En: Díaz E, Hernández L, Valero G, Arellano B editores. Diagnóstico de Brucelosis Animal. México: INIFAP, 2001: 106-113.
60. Sahagún RA, Arellano RB. Técnica de reacción en cadena de la polimerasa como herramienta en el diagnóstico de la brucelosis. En: Díaz E, Hernández L, Valero G, Arellano B editores. Diagnóstico de Brucelosis Animal. México: INIFAP, 2001: 114-123.
61. Díaz AE. Pruebas de Diagnóstico en brucelosis caprina. En: Díaz E, Hernández L, Valero G, Arellano B editores. Diagnóstico de Brucelosis Animal. México: INIFAP, 2001: 152-157.
62. Velázquez NJ. Diagnóstico de la brucelosis canina (*B. canis*) y preparación de antígenos rugosos. En: Díaz E, Hernández L, Valero G, Arellano B editores. Diagnóstico de Brucelosis Animal. México: INIFAP, 2001:183-189.
63. Salas TE, Núñez AA, Mejía SP. Diagnóstico de *Brucella ovis*. En: Díaz E, Hernández L, Valero G, Arellano B editores. Diagnóstico de Brucelosis Animal. México: INIFAP, 2001:140-145.
64. Díaz R, Leiva J, Rubio M, Dorronsoro. Diagnóstico de la brucelosis humana. En: Díaz E, Hernández L, Valero G, Arellano B editores. Diagnóstico de Brucelosis Animal. México: INIFAP, 2001: 198-212.

65. Brew SD, Perett LL, Stack JA, MacMillan AP, Staunton NJ. Human exposure to *Brucella* recovered from a sea mammal. Vet Rec 1999; 144: 483.
66. Roletto J, Mazzeo J. Identification of north american marine mammals. In: Dierauf LA editor. Handbook of marine mammal medicine, health, disease and rehabilitation. Boca Raton Florida: CRC press, 1990: 399-400
67. Alfonseca SE. Determinación de isotipos en perfiles serológicos mediante un inmunoensayo enzimático indirecto en cabras vacunadas y desafiadas con *Brucella spp* (tesis de maestría). México, D.F. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM, 1998.
68. Sánchez VJM, Cambra AM. Técnicas inmunoenzimáticas ELISA en patología animal y vegetal. 2nd. Francia: Office International Des Epizooties - Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias 1987.
69. Goward CR, Murphy JP, Atkinson T Barstow DA. Expression and purification of a truncated recombinant streptococcal protein G. Biochem J 1990;1: 267-171
70. Godinez RC, Zelaya RB, Auriolos GD, Verdugo RA, Rodriguez RE, De la Peña MA. Antibodies against *Leptospira interrogans* in California Sea Lion Pups from Gulf of California. J. of Wildlife Disease 1999; 35: 108-111.
71. Díaz AE, Marín C, Alonso UB, Aragón V, Pérez OS, Pardo M, Blasco M, Díaz R, Morriyón I. Evaluation of serological test for diagnosis of *Brucella malitensis* infection of goats. J. of Clinical Microbiology 1994; 32:1159-1165.
72. Harlow E, Lane D. Antibodies, a laboratory. NY USA: Cold Spring Harbor Laboratory 1988.

FIGURAS

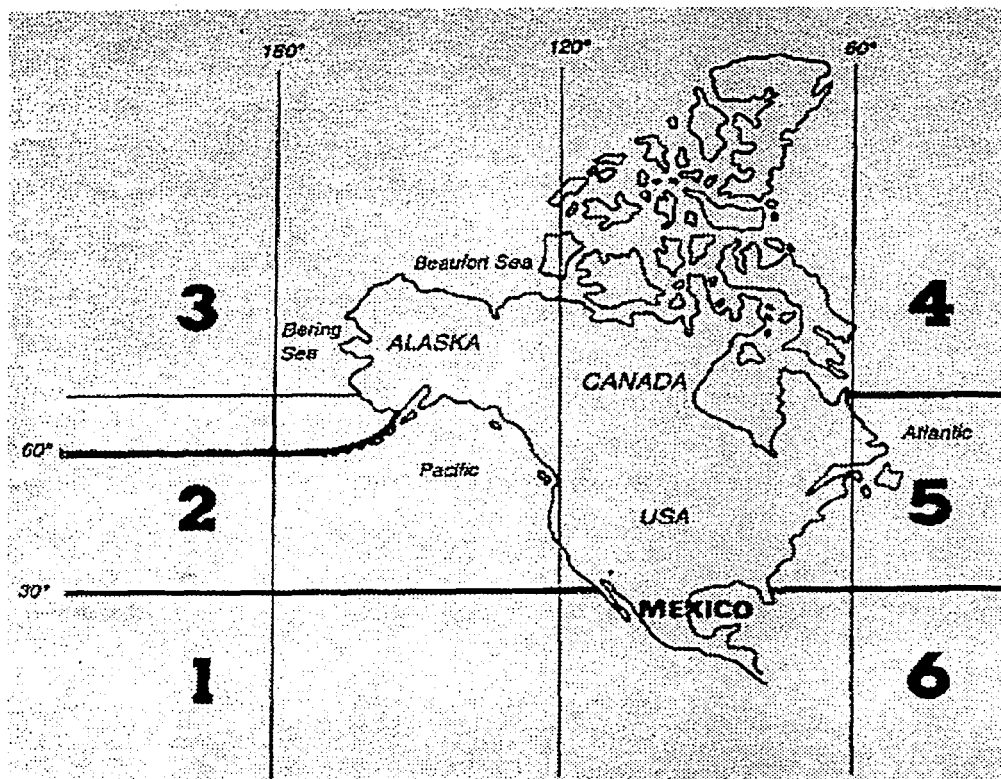


Figura 1. Distribución geográfica de las zonas donde habitan los mamíferos marinos de América del Norte (modificado del CRC Handbook of Marine Mammal Medicine: Health, Disease, and Rehabilitation). El Golfo de California se encuentra en la zona identificada como 1.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Figura 2. La distribución geográfica de las loberas donde se realizaron los muestreos serológicos dentro del Golfo de California : 1= Consag, 2= San Jorge, 3= Isla Lobos, 4= Isla Granito, 5= Los Cantiles, 6= Los Machos, 7= El Rasito, 8= San Esteban, 9= San Pedro Mártir, 10= Los Islotes.

**ELISA-I PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA
Brucella spp EN LOBOS MARINOS DEL GOLFO DE CALIFORNIA**

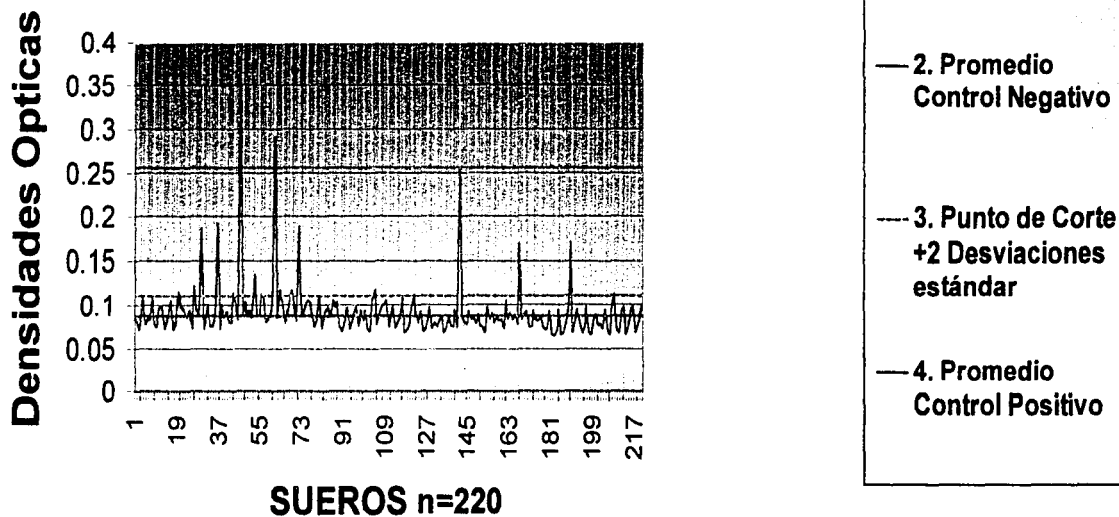


Figura 3. Se muestra la gráfica de las D.O. (A_{405}) de los sueros de lobos marinos del Golfo de California que se incluyeron en el inmunoensayo enzimático indirecto. 1= sueros lobos marinos, 2= Promedio de los controles negativos, 3= Punto de corte (+ 2 desviaciones estándar del promedio de los controles negativos), 4= Promedio de los controles positivos.

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

Figura 4. Diseño que se utilizó para colocar los sueros de lobos marinos en la placa de 96 pozos. En la primera columna se muestra la posición de los testigos. B= blanco, LM+= suero de lobo marino positivo, LM-= suero de lobo marino negativo, H= suero humano positivo, S1, S...= sueros de lobos marinos .

CUADROS

Sueros	Tarjeta (8%)	Tarjeta (3%)	Fijación del complemento	ELISA
RA19	+	+	1/32*	+
Lana	+	+	1/64*	+
MA18	+	+	1/8*	+
SPM2	+	+	1/4*	+
LM71	-	+	1/8*	+
LM61	+	+	AC	+
MA8	+	+	1/4*	-
SPM5	+	+	-	-
RA14	+	+	-	-
LI26	-	+	-	+
SJ9	-	+	-	+
LI2	-	+	-	+
MA6	+	+	-	-
LI8	-	-	-	+
LI19	-	-	-	+
GR29	-	+	AC	+
GR36	-	-	-	+
CA43	-	-	-	+
CA52	-	-	-	+
CA55	-	-	-	+
LM63	-	-	-	+
LM68	-	-	-	+
Total	9	14	6	18
Porcentaje	4	6	2	8

Tabla 1. Porcentaje de sueros positivos con tres pruebas distintas de diagnóstico de brucelosis en lobos marinos. n= 220; (+) = positivo; (-) = negativo; (*) = dilución; (AC) = anticomplementario.

Concordancia de Kappa	Tarjeta 3%	Tarjeta 3%	Total
	+	-	
ELISA +	10	8	18
ELISA -	4	198	202
Total	14	206	220

Cuadro 2. Se muestra la concordancia de Kappa en un cuadro de contingencia de 2x2 entre la prueba de tarjeta al 3% y ELISA. $Kappa = 0.6$, que representa una concordancia moderada.

Concordancia de Kappa	Tarjeta 8%	Tarjeta 8%	Total
	+	-	
ELISA +	5	13	18
ELISA -	4	198	202
Total	9	211	220

Cuadro 3. Se muestra la concordancia de Kappa en un cuadro de contingencia de 2x2 entre la prueba de tarjeta al 8% y ELISA. $Kappa = 0.3$, que representa una concordancia baja.

Densidades Opticas en ELISA-i con sueros de lobos marinos a los 30 minutos de incubación

Concertación de proteína A peroxidasa			
Dilución	Proteína A	Proteína A	Proteína A
Suero	1/250	1/500	1/1000
1/25	0.271	0.192	0.172
1/50	0.209	0.153	0.168
1/100	0.125	0.119	0.119

Cuadro 4. Se hace la comparación de la D.O. (A_{405}) alcanzada a los 30 minutos de incubación con diferentes concentraciones de proteína A peroxidasa.

Densidades Opticas ELISA-i con sueros de lobos marinos a los 60 minutos de incubación

Concentración de proteína A peroxidasa			
Dilución	Proteína A	Proteína A	Proteína A
Suero	1/250	1/500	1/1000
1/25	0.451	0.407	0.399
1/50	0.387	0.275	0.315
1/100	0.169	0.147	0.151

Cuadro 5. Se hace la comparación de la D.O. (A_{405}) alcanzada a los 60 minutos de incubación con diferentes concentraciones de proteína A peroxidasa.

ABREVIATURAS

A₄₀₅ absorbencia 405 nanómetros

Ac anticuerpo

Ag antígeno

CENASA Centro Nacional de Salud

Animal

CENID Centro Nacional de Investigación

Disciplinaria

CICIMAR Centro Interdisciplinario en

Ciencias Marinas

D.O. Densidad Óptica

DF Distrito Federal

EDTA (ethylenediaminetetra acetic acid):

ácido etilendiaminotetra acético

ELISA (enzyme linked immunosorbent

assay): ensayo de la enzima enlazada al

inmunoabsorbente

ELISA-c ensayo competitivo de la enzima

enlazada al inmunoabsorbente

ELISA-i ensayo indirecto de la enzima

enlazada al inmunoabsorbente

FAO (Food and Agricultural

Organization): Organización para la

Alimentación y la Agricultura

Ig inmunoglobulina

INIFAP Instituto Nacional de

Investigaciones Forestales, Agrícolas y

Pecuarias

INRA (Institut National de la Recherche

Agronomique): Instituto Nacional de la

Investigación Agronómica

IPN Instituto Politécnico Nacional

LPS Lipopolisacáridos

MVZ Médico Veterinario Zootecnista

NOM Norma Oficial Mexicana

OIE Oficina Internacional de Epizootias

OMS Organización Mundial de la Salud

OPS Organización Panamericana de la

Salud

PAIEPEME Patronato de Apoyo a la

Investigación y Experimentación Pecuaria

en México

PBS (phosphate buffered solution):

solución amortiguada de fosfatos

PCR (polymerase chain reaction): reacción
en cadena de la polimerasa

SAGARPA Secretaria de Agricultura

Ganadera Desarrollo Rural, Pesca y
Alimentación

SARH Secretaría de Agricultura y

Recursos Hidráulicos

SAV solución amortiguada con veronal

SCMV Sociedad Cubana de Microbiología

Veterinaria

SMPV Sociedad Mexicana de Patología

Veterinaria

UNAM Universidad Nacional Autónoma
de México

WHO (World Health Organization)

Organización Mundial de la Salud

APÉNDICE SOLUCIONES Y DILUENTES**Solución de cloruro de sodio amortiguada con veronal (SAV)**

- Cloruro de sodio 83.0 g
- Barbiturato de sodio 10.19 g
- Ácido clorhídrico 34.58 ml 1 N
- Solución concentrada de calcio y magnesio 5.0 ml

Solución concentrada de calcio y magnesio.

- Cloruro de magnesio hexahidrato 20.33 g
- Calcio dihidratado 4.41 g
- 100 ml de agua destilada.

Solución amortiguada de fosfatos (PBS)

- Cloruro de sodio 8.0 g
- Cloruro de potasio 0.2 g
- Di-hidrofosfato de sodio 1.44 g
- Di-hidrofosfato de potasio 0.24 g
- 1,000 ml de agua destilada

Solución amortiguada de fosfatos con Tween 80 (PBS T-80)

- Solución amortiguada de fosfatos 990 ml
- Tween-80 10 ml

Solución amortiguada de citrato de sodio

- Citrato de sodio 29.4 g 0.1 M, pH 5.0
- 1,000 ml de agua destilada

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN