



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

“EFICACIA DE LA PRUEBA DE ELISA INDIRECTA Y DE LA PRUEBA DE
FLUORESCENCIA POLARIZADA COMPARADA CON PRUEBAS OFICIALES
(PRUEBA DE ROSA DE BENGALA AL 3% Y FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO)
PARA EL DIAGNÓSTICO DE *Brucella melitensis* EN OVINOS
PRESUNTAMENTE INFECTADOS”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
RAQUEL MARTÍNEZ SANTILLÁN

ASESORES:

Dr. Efrén Díaz Aparicio.

Dr. José Francisco Morales Álvarez.

Cuautitlán Izcalli, Estado de México 2007.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Dedicatorias :

A Dios:

La roca de mi refugio, la fuerza en mi ser, mi inspiración y mi esperanza.

A mi Padre José :

Por su inmenso apoyo.

A la memoria de mi Madre Ernestina :

Por su gran amor y consejo para conmigo.

A mis hermanos: Noé, Álvaro, Adriana Mónica y Miguel Ángel :

Por su apoyo incondicional y ser ejemplo de perseverancia y superación.

A Noé Leví, Pamela, Alejandra, Alan, Saúl, Dan, Daniela y Tania :

Por mostrarme lo maravilloso de vivir.

Agradecimientos:

Al Dr. Efrén Díaz Aparicio por su paciencia y dedicación para la realización de éste trabajo.

Al Dr. Francisco Morales Álvarez por su valiosa ayuda para la asesoría de ésta tesis.

Al Dr. Carlos Ramírez Pfeiffer por su ayuda en la realización de la Prueba de Fluorescencia Polarizada.

Al Ing. Juan Rafael Garibay Bermúdez por su valiosa colaboración en el Análisis Estadístico presentado en ésta tesis.

A la Dra. Myrna Alicia Vicencio Mallén por el apoyo para la realización de la prueba de Fijación del complemento.

A todo el personal del CENID-Microbiología por compartir sus conocimientos durante el proceso experimental de éste trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme ser una de tus discípulas y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por haberme acogido en tus aulas.

A mis amigos que me han mostrado lo valioso de la amistad:

José Antonio eres el amigo alegre y confiable con el que indudablemente se puede contar.

Mario: si pudiera calificarte en dos palabras serían espontaneidad y la lealtad.

Carlos Alberto: eres el amigo para el que no es posible distinguir entre amigos y circunstancias.

René: lo que te caracteriza es la nobleza y la sencillez.

Sedyghe: muchas gracias por tu oportuna y diligente ayuda.

Ricardo: eres alguien tan especial que sabes que te quiero mucho.

El presente trabajo fue parcialmente financiado por SEP CONACYT. También contó con el apoyo del Laboratorio de Bacteriología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal (CENID-Microbiología) INIFAP-SAGARPA, con el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM y con el Laboratorio del Instituto Nacional de Investigación Forestal Agrícola y Pecuaria del Noreste.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Panorama de Brucelosis	1
1.2. Estructura del Género <i>Brucella</i>	2
1.3. Factores de virulencia de <i>Brucella</i>	3
1.4. Patogenia	4
1.5. Epidemiología	5
1.6. Respuesta inmune	6
1.6.1 Innata	6
1.6.2 Humoral	7
1.6.3 Específica	7
1.7. Respuesta post-vacunación	9
1.8. Diagnóstico	10
1.8.1 Métodos Directos	10
1.8.2 Métodos Indirectos	11
1.9. Descripción de pruebas serológicas	13
1.9.1 Prueba de Rosa de Bengala al 3%	13
1.9.2 Prueba de Fijación del Complemento	13
1.9.3 Inmunoensayo Enzimático Ligado a Enzimas Indirecto	14
1.9.4 Fluorescencia Polarizada	15
2. JUSTIFICACIÓN	16
3. HIPÓTESIS	18

4. OBJETIVOS	18
4.1 Objetivo General	18
4.2 Objetivos Específicos	18
5. MATERIALES Y MÉTODOS	19
5.1 Grupos Formados.	19
5.1.1 Grupo problema	19
5.1.2 Grupo control positivo	19
5.1.3 Grupo control negativo	20
5.2 Estudio Serológico	20
5.2.1 Prueba de Rosa de Bengala al 3%	20
5.2.2 Prueba de ELISA Indirecta	20
5.2.3 Prueba de Fijación del Complemento	21
5.2.4 Prueba de Fluorescencia Polarizada	22
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	22
7. RESULTADOS	23
8. DISCUSIÓN	31
9. CONCLUSIONES	36
10. LITERATURA CITADA	37
11. ANEXOS	42

RESUMEN

Este trabajo tuvo como objetivo determinar el porcentaje de efectividad de la prueba de Rosa de Bengala (RB) al 3% comparando los resultados con las pruebas de Fijación del Complemento (FC), Inmunoensayo Ligado a Enzimas Indirecto (ELISA-i) y Fluorescencia Polarizada (FP), al grupo problema formado por 126 muestras de suero de ovinos RB-positivas, reunidas en un periodo de seis meses en el CENID-Microbiología y provenientes de varios rebaños de los Estados de México, Puebla, Querétaro, Jalisco y San Luis Potosí, también se emplearon 10 muestras de suero de ovinos de los cuales se aisló *B. melitensis* biotipo 1 (grupo control positivo) y 9 muestras de sueros de ovinos procedentes de un hato libre de brucelosis (grupo control negativo). En la prueba de ELISA indirecta se usó como antígeno lipopolisacárido liso (LPS-L) de la cepa lisa 16M de *B. melitensis* con un punto de corte de 1.000 de Densidad Óptica para considerar a los sueros positivos, la prueba de FC fue realizada empleando la técnica en tubo, considerando positivas aquellas muestras que presentaron hemólisis del 50 % con un título $\geq 1:4$ y la prueba de FP se realizó usando como antígeno un complejo de polisacárido O de *B. abortus* conjugado con isotiocianato de fluoresceína, con un punto de corte de 77 unidades de milipolarización (mP). Se obtuvo con el coeficiente de contingencia el porcentaje de efectividad de todas las pruebas. La prueba RB se considero 100 % efectiva porque el total de muestras problema fueron RB-positivas y por dar resultados esperados en los grupos control positivo y negativo, obteniendo para ELISA-I el 56.86%, para FC el 53.93% y por último 22.21% para FP. Concluyendo que la prueba de ELISA-i podría ser usada como prueba de escrutinio ya que es más confiable que la RB dando una menor cantidad de animales falsos positivos, por otro lado la FC aunque su uso se ve restringido por su elevado costo, su dificultad técnica aunado a que la realizan en cinco laboratorios de México, y por último concluimos

que para evaluar la prueba de FP en ovinos se requiere la generación de más investigaciones en esta especie, ya que hay pocos artículos científicos de referencia y los existentes están basados en bovinos o en otras especies.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Panorama de Brucelosis

La brucelosis está incluida en la lista B de enfermedades de conformidad con las disposiciones de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) que comprende “enfermedades transmisibles que se consideran importantes desde el punto de vista socioeconómico y/o sanitario para las economías nacionales y cuyos efectos para el comercio internacional de animales y productos pecuarios no son desdeñables”. (1)

La distribución geográfica en el mundo de *Brucella melitensis* se encuentra principalmente en el Mediterráneo, la península Árabe, Asia, algunas partes de África, Latinoamérica y América del Sur. (26) Tradicionalmente México ha sido reconocido como un país endémico de brucelosis, impactando económicamente la salud animal disminuyendo su producción y la de sus productos derivados, siendo objeto de restricciones en mercados locales y globales. Por otro lado, también constituye un problema significativo en salud pública causando una enfermedad febril aguda (fiebre ondulante) que puede progresar hacia una forma crónica produciendo serias complicaciones que afectan al sistema músculo esquelético, cardiovascular y nervioso central (25), siendo *B. melitensis* el principal agente causal de brucelosis humana en México vinculado principalmente con el consumo de leche cruda y sus derivados, lo que se traduce en costos de diagnóstico y tratamiento de aproximadamente US \$ 150,000 por año. (13)

En México se han aislado cinco de las siete especies de *Brucella*, esto incluye a *B. melitensis* biovariedades 1-3; *B. abortus* biovariedades 1, 2, 4-6; *B. suis* biovariedad 1; *B. canis* y *B. ovis*. Algunos aislamientos se han hecho en especies animales que no son su hospedero tradicional; por ejemplo una cepa de *B. suis* fue aislada de queso de leche de vaca y algunas cepas de *B. melitensis* fueron aisladas de leche de vaca. (15) También han sido observados casos esporádicos causados por *B. abortus* o *B. suis* en ovinos y cabras. (24)

1.2 Estructura del Género *Brucella*

Los miembros del género *Brucella* son bacterias Gram (-) en forma de cocobacilos cortos, capaces de sobrevivir y multiplicarse dentro de los fagocitos del hospedador en el cual estimulan una respuesta celular y humoral, por lo que se considera éste como el factor que le confiere su virulencia. (32)

La estructura más característica de la bacteria es su envoltura celular, formada por una membrana interna, una membrana externa y un espacio periplásmico intermedio que contiene algunas enzimas y proteínas relacionadas con el transporte de solutos y un gel glucopeptídico denominado peptidoglicano que es responsable de la forma e integridad osmótica de la bacteria. La membrana externa contiene distribuidos asimétricamente fosfolípidos, proteínas y un lipopolisacárido (LPS), considerado el principal antígeno; que consta de una parte glucolípídica (lípidos A), el cuál se inserta en la membrana externa, y otra polisacáridica dirigida hacia el exterior, dividida en dos secciones: el núcleo más interno y la cadena O. (32)

Las especies de *Brucella* que en forma natural carecen de la cadena O se denominan especies rugosas (*B. ovis* y *B. canis*) y las especies que sí la poseen son llamadas especies lisas (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, y *B. neotomae*). Ésta diferencia es muy importante ya que las brucelas más patógenas para el hombre son *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis*, que tienen LPS en fase lisa (LPS-S), con excepción de *B. canis* que a pesar de que es una especie rugosa también es patógena para el hombre. (20)

1.3 Factores de virulencia de *Brucella*.

- La interferencia en la formación del fagolisosoma ya que no se acidifica a un pH bajo y la modificación del tránsito intracelular al utilizar el citoesqueleto para el movimiento y la diseminación. (31)
- El LPS en fase lisa es portador de antígenos inmunodominantes y presenta en su extremo terminal moléculas de manosa que favorecen la adherencia a los fagocitos mononucleares, además de que induce la activación de linfocitos B y la respuesta inmune humoral. (3)
- Un componente externo de la membrana externa denominado lipido A del LPS resiste a los péptidos cationicos bactericidas debido a las enzimas superoxidodismutasa y proteasa, que son componentes de defensa contra la respuesta oxidativa generada por el animal. (31)

- El peptidoglicano asociado con proteínas de la membrana externa de la bacteria, interfiere con la capacidad bactericida del suero y permite a la bacteria resistir a los mecanismos de lisis ejercidos por los anticuerpos y el complemento. (3)

1.4 Patogenia

Posterior a su entrada al hospedador a través de las vías digestiva, nasofaríngea, vaginal, conjuntival y cutánea, la bacteria migra vía linfática hacia los primeros nódulos linfáticos regionales donde se multiplica correspondiente al periodo de incubación, con una duración de entre 14 y 180 días, que depende de la etapa de gestación, edad, vacunación así como la cantidad y virulencia de las bacterias (9). A partir de los nódulos linfáticos se produce una colonización de muchos grupos ganglionares y de órganos con abundante trama linforeticular como el bazo, el hígado o la médula ósea, provocando, sucesivas ondas bacterémicas que, generalmente producen un periodo febril en el hospedador (9). En ésta fase la infección alcanza la placenta y se implanta, pero cualquier mecanismo inmune capaz de reducir el nivel y/o duración de la bacteriemia puede reducir las posibilidades de colonización. En los animales totalmente receptivos, tanto gestantes como no gestantes, *B. melitensis* está presente en la sangre durante 30-45 días después de la infección. (9)

Al colonizar los cotiledones placentarios y el útero, *Brucella* se multiplica activamente en el epitelio que reviste las vellosidades embrionarias del corion y la mucosa uterina propagándose entre ellas y produciendo procesos inflamatorios, que

posteriormente son necróticos, alterando las conexiones entre la placenta fetal y materna, finalmente atraviesan la barrera placentaria y se localizan en el feto, principalmente en el pulmón, bazo, hígado, miocardio y contenido del abomaso, alterando la nutrición y oxigenación del feto, dando lugar a la muerte y expulsión del mismo, pudiendo colonizar la glándula mamaria y reducir o cesar la producción de leche. (9)

En las hembras vacías puede presentarse la enfermedad en forma crónica que se caracteriza por la colonización del sistema linforeticular, quedando infectadas de por vida, ya que después de una respuesta serológica inicial, es decir con la producción inicial de inmunoglobulinas del isotipo IgM permanece constante su concentración de una a tres semanas, dándose posteriormente la producción de IgG incrementándose hasta ser dominante aún después de diez meses, convirtiéndose la infección en inaparente, lo que puede dificultar el diagnóstico. (9)

1.5 Epidemiología

Los abortos se presentan con frecuencia en masa en el rebaño a lo largo del primer y segundo año de la introducción de *B. melitensis* principalmente entre las hembras primíparas durante el último tercio de la gestación. En contraste, las hembras que pertenecen a rebaños con brucelosis crónica, son menos propensas a abortar, siendo los productos procedentes del aborto (feto, membranas fetales, secreciones vaginales) la fuente principal para infectar animales susceptibles por un lapso de tres a ocho semanas. Por otro lado, la cantidad de brucelas excretadas en

la leche no suele ser importante para la transmisión entre ovejas, pero sí lo es para la transmisión de la infección a la especie humana. (27)

Algunos autores coinciden en señalar que el proceso de “autocuración” que se atribuye a las ovejas por el hecho de que abortan solamente una vez y que hace que disminuya el número de abortos en el rebaño hasta su aparente desaparición, nunca debería considerarse como absoluto. (9)

1.6 Respuesta inmune contra *Brucella*.

1.6.1 *Innata*.

En animales resistentes, una vez que la bacteria ha sido fagocitada por un macrófago, es expuesta a los compartimentos fagolisosomales pudiendo inhibir el ensamblaje de la fusión fagosoma-lisosoma. Una vez opsonizada, la bacteria induce la liberación de radicales de oxígeno en el macrófago produciendo también la liberación de enzimas hidrolíticas presentes en los polimorfonucleares neutrófilos los cuales utilizan sus gránulos para destruir microorganismos invasores, en animales susceptibles, la degranulación de éstas células puede ser inhibida por *Brucella*. (31)

Los fagocitos mononucleares tienen en su superficie muchos receptores específicos para muchos ligandos, uno de ellos son los ligandos de integrinas, por lo que se ha sugerido que poseen especificidad de unión para moléculas superficiales como el LPS, lo que dispara la activación de células inmunes inespecíficas y sus mecanismos efectores como la fagocitosis. (3)

1.6.2 Humoral

Posterior a la infección natural o la vacunación, la respuesta inmune es inducida por el LPS, que es el primer antígeno frente al que aparecen anticuerpos de tipo IgM e IgG que son los anticuerpos que pueden opsonizar cepas patógenas y así pueden ser invadidas nuevas células fagocíticas potenciando la infección. (31)

1.6.3 Específica

Durante el curso de la infección *Brucella* se asocia principalmente a las células, por consiguiente las células infectadas necesitan matar a la bacteria o morir para que la bacteria pueda ser atacada por otros mecanismos de eliminación como los mediados por anticuerpos. Las estructuras moleculares en la superficie del microorganismo son primero reconocidas por los receptores llamados tipo *tool* los cuales liberan señales para activar las células presentadoras de antígenos (APC) y facilitar la fagocitosis de la bacteria, siendo ésta reacción dada por la inmunidad innata. Las células NK juegan un papel importante en la fase temprana en respuesta a la invasión del microorganismo. Las células que fueron internalizadas son muertas y procesadas hasta reducirlas a péptidos los cuales se expresan en la superficie de las APC en asociación del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) I y II. Las células T reconocen éste complejo por medio de receptores específicos de células T (TCRs). Las APC usualmente poseen dos señales que se requieren para una óptima activación de las células T. (4)

Vía unión TCR/MHC-péptido y vía moléculas coestimuladoras B7.1 y B7.2, de las APC que se unen al receptor CD28 de las células T. (4)

Las células T activadas a su vez pueden activar APC por el ligando CD40 que aumenta la producción de APC y de Interferón gamma (INF γ) que activa la producción de macrófagos, y potencia su actividad microbicida al estimular la síntesis de intermediarios de oxígeno y óxido nítrico, además que regula negativamente la expresión de citocinas Th2 como la interleucina 10, que regula negativamente esos mecanismos. (4)

La activación de las T-CD4 puede resultar en su diferenciación en células efectoras o células de memoria, dependiendo probablemente de la naturaleza del antígeno, las citocinas que secretan son:

Células Th1 que secretan IL-2 e INF γ

Células Th2 que secretan IL-4 e IL5

Las citocinas secretadas por las CD4 ayudan las células T-CD3 a diferenciarse en células T citotóxicas y las células B en células B plasmáticas (anticuerpos). Además las células B también son estimuladas por el ligando CD40 que es un importante promotor para iniciar la producción de IgM y subclases de IgG como la IgG₂, que tiene una mayor capacidad para reconocer antígenos microbiales en la superficie de las células infectadas, atribuidas principalmente a la longitud y flexibilidad de la región de bisagra. (4)

Al igual que las células T-CD4, las células TCD8 se diferencian de las células T citotóxicas tipo 1 (Tc1), células citotóxicas tipo 2 (Tc2), las cuáles se diferencian por las citocinas producidas, sin embargo, las células Tc1 predominan en caso de una respuesta por células TCD8 que secretan INF γ más que IL-4, pudiendo así matar células blanco. En la mayoría de las infecciones causadas por *Brucella*, las diferentes células del sistema inmune (APCs, NK, T y B) actúan juntas para incitar una respuesta coordinada. (4)

1.7 Respuesta Post-vacunación.

La vacuna Rev 1 de *B. melitensis* es la mejor vacuna disponible, aplicada a dosis completa (10)⁹ por vía subcutánea en animales de reemplazo de 3 a 6 meses de edad, aunque puede producir abortos en hembras gestantes cuando se aplica durante los primeros dos tercios de la gestación, ya que induce una larga y duradera respuesta serológica. En los animales infectados como en los vacunados, la respuesta humoral incluye la síntesis de anticuerpos IgM e IgG sin embargo, en la vacunación el nivel de anticuerpos cae rápidamente de tal manera que a los seis meses no se encuentra IgG₂ y solamente persisten bajos niveles de IgM e IgG₁ en contraste, en los animales infectados persisten después de seis meses altos niveles de IgG₁ e IgG₂. (12) Por ello, es difícil encontrar una prueba serológica capaz de distinguir entre animales infectados con cepas de campo de *B. melitensis* y animales vacunados con Rev 1, y que además no impida la combinación del uso de vacunación, pruebas serológicas y programas de sacrificio (5), por lo que algunos

autores recomiendan la administración de la vacuna por vía conjuntival ya que produce una respuesta serológica de baja intensidad y corta duración. (7)

En cabras jóvenes, se ha observado que posterior a la vacunación se alcanzan títulos de aglutinación alrededor de dos semanas, arriba de 1280 UI, que rápidamente caen pero que a los seis meses posvacunación aún el 14 % de animales son positivos con títulos de 800 UI y a un año el 2% de cabras. En comparación con la prueba de fijación del complemento (FC) la caída subsecuente es más rápida y todas las cabras llegaron a ser negativas en el año siguiente a la vacunación, con la excepción de uno que presentó un título de 1/10. (21) En años subsecuentes, todas las cabras fueron negativas a FC, también fue establecida la respuesta serológica en ovinos utilizando las mismas pruebas, resultando casi idénticas, estableciendo más reacciones persistentes en ovinos, reportando el 30% de ovejas positivas un año después de la vacunación y el 10 % resultaron aún positivas después de 20 meses. (9)

1.8 Diagnóstico.

1.8.1 Métodos directos.

Se basan en aislar e identificar la bacteria a partir de tejidos infectados, leche o sangre mediante técnicas microscópicas, pero tienen la desventaja de ser procedimientos laboriosos, y que además requieren medios selectivos para crecer. (12, 18)

Diagnóstico bacterioscópico: Consiste en tomar una muestra de exudado proveniente de un animal infectado en un frotis, usando la tinción de Stamp la cual hace que se observen las bacterias de forma cocoide teñidas de color rojo sobre un fondo verde del que se tiñen los exudados o restos celulares, debiendo considerar que otras bacterias como *Clamidia psitacci* también se tiñen de rojo solamente que son más pequeñas que las brucelas, además de que son pleomórficas por lo que se requiere una amplia experiencia para poder diferenciarlas además de que ambas bacterias producen aborto. (17)

Identificación del agente etiológico: Se realiza analizando la morfología de las colonias bacterianas tomando la muestra de material del aborto o descargas vaginales que se siembran en medios de cultivo ordinarios como agar sangre, tripticosa soya o agar brucella, en una atmósfera aerobia. (22)

1.8.2 Métodos indirectos.

Métodos alérgicos: Una prueba de intradermorreacción conocida como Brucelina consiste en la inoculación de extractos proteicos de *Brucella melitensis* vía intradérmica observándose una reacción cutánea local a 72 horas de su aplicación, en animales sensibilizados debido a infección o vacunación con cepas del género *Brucella*, por ello es útil solamente en rebaños no vacunados, ya que la vacunación interfiere con el resultado de la prueba. (2,18)

Métodos serológicos: De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995 Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales, las pruebas

inmunológicas establecidas para el diagnóstico de brucelas lisas en ovinos son: la prueba de tarjeta (rosa de Bengala) al 3% como prueba tamiz, es decir, que ésta prueba solamente diferencia entre animales positivos de animales negativos por lo que es necesario que las muestras que resulten positivas a rosa de Bengala deberán ser sometidas a Fijación del Complemento como prueba confirmatoria. Por otro lado el manual de la OIE menciona que últimamente se han obtenido buenos resultados con otras pruebas como el Inmunoensayo Indirecto (ELISA-I), que se emplea entre otros antígenos, el LPS liso por haber sido hasta ahora el más preciso y que además ofrece igual o mayor sensibilidad que RB y FC. (24)

Otra prueba que ha obtenido resultados alentadores en la detección de anticuerpos específicos de *Brucella abortus* en bovinos es la Fluorescencia Polarizada (FPA), tan es así que en países como Estados Unidos y Canadá ya es una prueba oficial. En México aún se encuentra en experimentación por lo que se requieren más estudios de investigación específicamente en ovinos. (28)

1.9 Descripción de Pruebas serológicas

1.9.1 Prueba de rosa de Bengala (RB)

Es una prueba cualitativa y rápida en la cual se emplea como antígeno una cepa lisa de *B. abortus* acidificado a un pH de 3.65 adicionando ácido láctico, que impide la actividad de los anticuerpos que aglutinan inespecíficamente y teñido con un colorante (rosa de Bengala), haciendo que se unan los anticuerpos específicos de los isotipos IgM e IgG₁ al LPS del antígeno, observándose una aglutinación macroscópica. Es una prueba muy sencilla y 100% sensible, que no presenta falsos negativos aunque su especificidad es baja (77.6%), por lo que presenta alrededor de 32% de falsos positivos, además de que es la prueba menos capaz de diferenciar entre animales infectados de vacunados. (12)

1.9.2 Fijación del Complemento (FC)

Es la prueba confirmatoria más utilizada, sin embargo es laboriosa, requiere muchos reactivos, y no pueden ser probados sueros hemolizados. Ésta se basa en que los anticuerpos reaccionan con el antígeno, activando el complemento, algunos de cuyos componentes actúan como hemolisinas. Consta de dos etapas: reacción antígeno-anticuerpo que inicia cuando se produce la reacción entre los anticuerpos y la suspensión bacteriana que se usa como antígeno, el complemento añadido en cantidad previamente determinada se fija en mayor o menor grado, dependiendo de la cantidad de anticuerpos específicos presentes. Y la visualización de la reacción

que consiste en añadir anticuerpos antihematíes de carnero y hematíes de carnero. Si queda complemento sin fijar en la primera fase, los hematíes se hemolizarán y por tanto la reacción será negativa. Por el contrario la ausencia de hemólisis indica presencia de IgM o IgG₁ específicas anti-LPS de *Brucella*. Esta prueba tiene una sensibilidad del 95 al 100% y una especificidad del 100% en ovinos infectados por *B. melitensis*. (12)

1.9.3 Inmunoensayo Enzimático Ligado a Enzimas (ELISA).

La utilización de enzimas como una señal de amplificación en ensayos primarios fue implementada en el inicio de 1970, desde entonces, ha llegado a ser la técnica de inmunoensayo más utilizada con aplicaciones en el diagnóstico serológico en humanos y en animales. (6)

Una vez adsorbido el antígeno al fondo de los pozos de las placas, se incuban con el suero problema, los anticuerpos retenidos por el antígeno se detectan por un segundo anticuerpo conjugado a una enzima que después se revela adicionando un sustrato, el resultado obtenido es una solución coloreada siendo directamente proporcional el anticuerpo fijado. (30)

En el diagnóstico de brucelosis ovina se ha encontrado que la prueba de ELISA indirecta empleando LPS liso como antígeno ha obteniendo una sensibilidad del 98.6 % y una especificidad del 100 %. (6)

1.9.4 Fluorescencia Polarizada (FP)

Actualmente está validada para bovinos y es capaz de distinguir animales infectados de animales vacunados con la cepa S19 de *Brucella abortus* (excepto los primeros tres meses post-vacunación y para animales persistentemente infectados con la cepa S19. También distingue animales infectados con bacterias Gram negativas con reacciones cruzadas a *Brucella* en más del 90% de los casos. (28)

Se fundamenta en que las moléculas fluorescentes al ser excitadas por un haz de luz polarizada en un plano, emiten una fluorescencia en el mismo plano de polarización, suponiendo que las moléculas permanecieran inmóviles, sin embargo, si las moléculas están excitadas están rotando en desorden durante el periodo de tiempo de fluorescencia o estado excitado (el tiempo que transcurre entre la absorción de la luz y la emisión de la fluorescencia), entonces la fluorescencia es emitida hacia diferentes planos en relación al plano usado para la excitación, resultando en la despolarización de la luz emitida. Los valores de la polarización (P) de la fluorescencia son medidos, usando las intensidades (I) de la luz polarizada emitida ya sea paralela o perpendicular a la dirección del vector eléctrico de la fuente de luz polarizada excitante. (28)

En un estudio realizado por Minas y col., 2005 (18) en el que se usaron 166 sueros de ovinos naturalmente infectados verificados por cultivo positivo y 851 sueros de animales de zonas libres de *Brucella*, obtuvieron una sensibilidad del 97.6% y una especificidad del 98.9%.

2. JUSTIFICACIÓN

El diagnóstico de brucelosis en ovinos causada por brucelas lisas se debe realizar usando la prueba de rosa de Bengala al 3% (RB) como prueba tamiz y la prueba de fijación del Complemento (FC) como prueba confirmatoria. (23) Para rebaños de ovinos infectados, la prueba de RB puede ser usada directamente como prueba confirmatoria, (29) por otro lado, el uso de la prueba de FC es limitado debido a que se realiza solamente en 5 de los 125 laboratorios aprobados, su elevado costo, su lenta realización y su complejo procedimiento. (29) Por ello, de acuerdo con la experiencia en el CENID- Microbiología, la mayoría de los productores que remiten sus muestras para diagnóstico de brucelosis solamente solicitan la prueba de RB, por ser ésta un requisito indispensable para la movilización de los animales no siendo así para la prueba de FC.

En años recientes, con la prueba de ELISA-i se han obtenido buenos resultados como los que obtuvo Ferreira y col., 2003 (13) en el cual se usaron 219 animales cultivo positivo a *Brucella melitensis* biotipo 3 y 212 animales provenientes de rebaños libres de *Brucella*, obteniendo una sensibilidad de 96.8 % y una especificidad del 100%, empleando como antígeno LPS liso de la cepa 99 de *Brucella abortus* siendo la prueba más sensible la ELISA-I, en segundo lugar la prueba de RB y por último la prueba de FC.

También se ha empezado a experimentar con la prueba de Fluorescencia Polarizada (FP) para el diagnóstico de brucelosis ovina (excluyendo la causada por *Brucella ovis*), recientemente en Grecia se obtuvieron resultados promisorios, en un estudio realizado por Minas y col., 2005 (19), en el que se usaron 166 sueros de animales naturalmente infectados verificados por cultivo positivo y 851 sueros de animales de zonas libres de *Brucella*, obteniendo una sensibilidad de 97.6% y una especificidad del 98.9% en la prueba de FP y 97.5% y 100% en la prueba de ELISA-i.

En México, un estudio realizado por Pfeiffer y col., 2005 (29) empleando la prueba de Florescencia Polarizada en cabras, con un punto de corte de 89 mP (unidades de milipolarización) en el que obtuvieron una sensibilidad de 82.2 %, usando 1488 animales positivos a RB/FC y una especificidad de 82.2%, con 1094 animales RB negativo o RB positivos y FC negativos, pero al emplear 702 animales de zonas libres aumento la especificidad a 95.8 %.

Por ello, hemos considerado necesario conocer si la prueba de RB es suficiente para confirmar o descartar a una animal como positivo o negativo, ya que dicha prueba es empleada como única herramienta en la mayoría de los rebaños en México.

3. HIPÓTESIS.

Si la prueba de RB es una opción suficiente para el diagnóstico de brucelosis ovina, al emplear sueros RB-positivos y compararlos con pruebas más sensibles y específicas como FC, ELISA-i y FP, entonces resultarán verdaderos positivos.

4. OBJETIVOS.

4.1 Objetivo General.

Determinar la eficacia de la prueba de RB al 3%, aplicada a un grupo de 126 muestras de sueros de ovinos RB-positivos, para ver el porcentaje de efectividad de las pruebas de FC, ELISA-i y FP.

4.2. Objetivos Específicos.

Someter a los sueros del grupo problema positivos a la prueba de RB a la prueba de FC, según la NOM 041 usando células completas de la cepa 1119.3 de *Brucella abortus* para comparar el porcentaje de efectividad de ambas pruebas.

Implementar la prueba de ELISA-i usando como antígeno LPS de la cepa 16M de *Brucella melitensis* para comparar el porcentaje de efectividad entre los resultados obtenidos con RB, FC y FP.

Realizar la prueba de FP usando como antígeno Polisacárido O de la cepa 1119.3 de *Brucella abortus* a los sueros problema RB-positivos para comparar el porcentaje de efectividad de las pruebas RB, FC y ELISA-I.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Grupos Formados.

5.1.1 Grupo problema

Integrado por 126 muestras de sueros ovinos, que resultaron positivos a la prueba rosa de Bengala al 3%, de un total de 540 ingresadas para el diagnóstico de brucelas lisas, en el período comprendido del 7 de octubre de 2004 al 27 de Marzo de 2005, estas muestras no presentaban hemólisis, contaminación y provenían de animales no vacunados.

5.1.2 Grupo Control Positivo.

Se seleccionaron 10 muestras de sueros de ovinos sin contaminación ni hemólisis de un total de 22 muestras, de animales con aislamiento positivo a *Brucella melitensis* biotipo 1.

5.1.3 Grupo Control Negativo

Se seleccionaron 9 muestras de sueros de ovinos provenientes de un hato y una zona libre de brucelosis.

5.2. Estudio Serológico.

5.2.1 Prueba de Rosa de Bengala al 3 %.

Se retiraron los sueros y el antígeno de refrigeración y se mantuvieron a temperatura ambiente 30 min previos a la realización de la prueba. En una placa de vidrio se depositaron 30 µl de suero por muestra, posteriormente se depositaron 30 µl del antígeno amortiguado de la cepa 1119-3 de *Brucella abortus* con una concentración del 3%, imprimiendo un movimiento rotatorio durante 4 minutos. Pasado éste tiempo, se procedió a realizar la lectura con la ayuda de un aglutinoscopio, tomándose como positivos aquellas muestras que presentaran cualquier grado de aglutinación. (16)

5.2.2 Prueba de ELISA Indirecta.

Adsorción del antígeno

A las microplacas de poliestireno de fondo plano se agregaron 100 µl de antígeno (ver Anexos) en cada pozo incubando durante 24 horas a 37 °C. Pasado

este tiempo se realizó un ciclo de tres lavados con PBS Tween-20 mediante un lavador de microplacas (Immuno-wash NUNC). Se agregó una solución de leche descremada al 2% en PBS, con la finalidad de ocupar sitios en donde no hubo adsorción del antígeno, dejándola por 60 minutos a 37 °C. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 20. Por último se cubrieron las placas con papel aluminio y se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

Procedimiento.

Se depositaron 100 µl de suero problema en cada pozo a una dilución 1:200 en PBS, incubando a 37°C en una estufa bacteriológica por espacio de 60 minutos, posteriormente se realizaron tres lavados con PBS Tween-20.

Se agregaron 100 µl de conjugado Rabbit anti-sheep IgG en cada pozo a una dilución de 1:2000 en PBS, incubando 60 minutos a 37°C, se realizaron tres lavados con PBS Tween-20 y se adicionaron 100 µl de sustrato (ABTS de Sigma Chemicals Co.) manteniendo las placas en agitación durante 15 minutos. Inmediatamente después se realizó la lectura en un espectrofotómetro múltiple calibrado a 405 nm. (EIA multi-well reader de Sigma Diagnostics) (6)

5.2.3 Prueba de Fijación del Complemento.

Esta prueba se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, con la colaboración de la Dra. Myrna

Alicia Vicencio Mallén, de acuerdo a la técnica descrita en: Díaz-Aparicio E, Hernández-Andrade L, Valero-Elizondo G, Arellano-Reynoso B. “Diagnóstico de Brucelosis Animal”, empleando la técnica en tubo, considerando positivas las muestras con un título \geq a 1:4 y con hemólisis del 50%. (10)

5.2.4 Prueba de Fluorescencia Polarizada.

Esta prueba se realizó en el INIFAP Noreste, con la colaboración del Dr. Carlos Ramírez Pfeiffer, de acuerdo a la técnica descrita en: Díaz-Aparicio E, Hernández-Andrade L, Valero-Elizondo G, Arellano-Reynoso B. “Diagnóstico de Brucelosis Animal”. Empleando un punto de corte de 77 unidades de milipolarización (mP). (28)

6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La técnica estadística usada en éste estudio fue la distribución $J\chi^2$, que es útil en el análisis de frecuencias de datos, para probar una hipótesis cuando los datos están en forma de frecuencias. (11)

7 RESULTADOS.

En el gráfico 1, se puede observar el comportamiento de las muestras en la prueba de ELISA-i, en la cual se estableció que aquellas muestras > 1.000 se considerarían como positivas y las muestras < 1.000 se considerarían como negativas.

En los resultados del grupo control positivo de las pruebas RB y ELISA-i (tabla 1), todos resultaron positivos y los sueros del grupo control negativo, todos resultaron negativos, no siendo así en las pruebas de FC y FP, lo que indica posibles deficiencias en la realización de las técnicas.

En la FP solo un suero del grupo control negativo fue negativo y en el grupo control positivo 5 sueros fueron positivos, en la prueba de FC todos los sueros control negativo resultaron ser negativos y de los sueros control positivo 8 fueron positivos. En estas dos pruebas un suero del grupo control positivo resultó anticomplementario para la prueba de FC y no concluyente para la prueba de FP.

La prueba con mayor número de muestras positivas en el grupo problema fue la FP con 114 muestras, seguida de la ELISA-i con 92 muestras positivas y la prueba con menos sueros positivos fue FC con solamente 22 muestras.

Gráfico 1 Distribución de los valores de densidad óptica obtenidos de la prueba de ELISA I usando como antígeno LPS de la cepa 16M de *Brucella melitensis*.

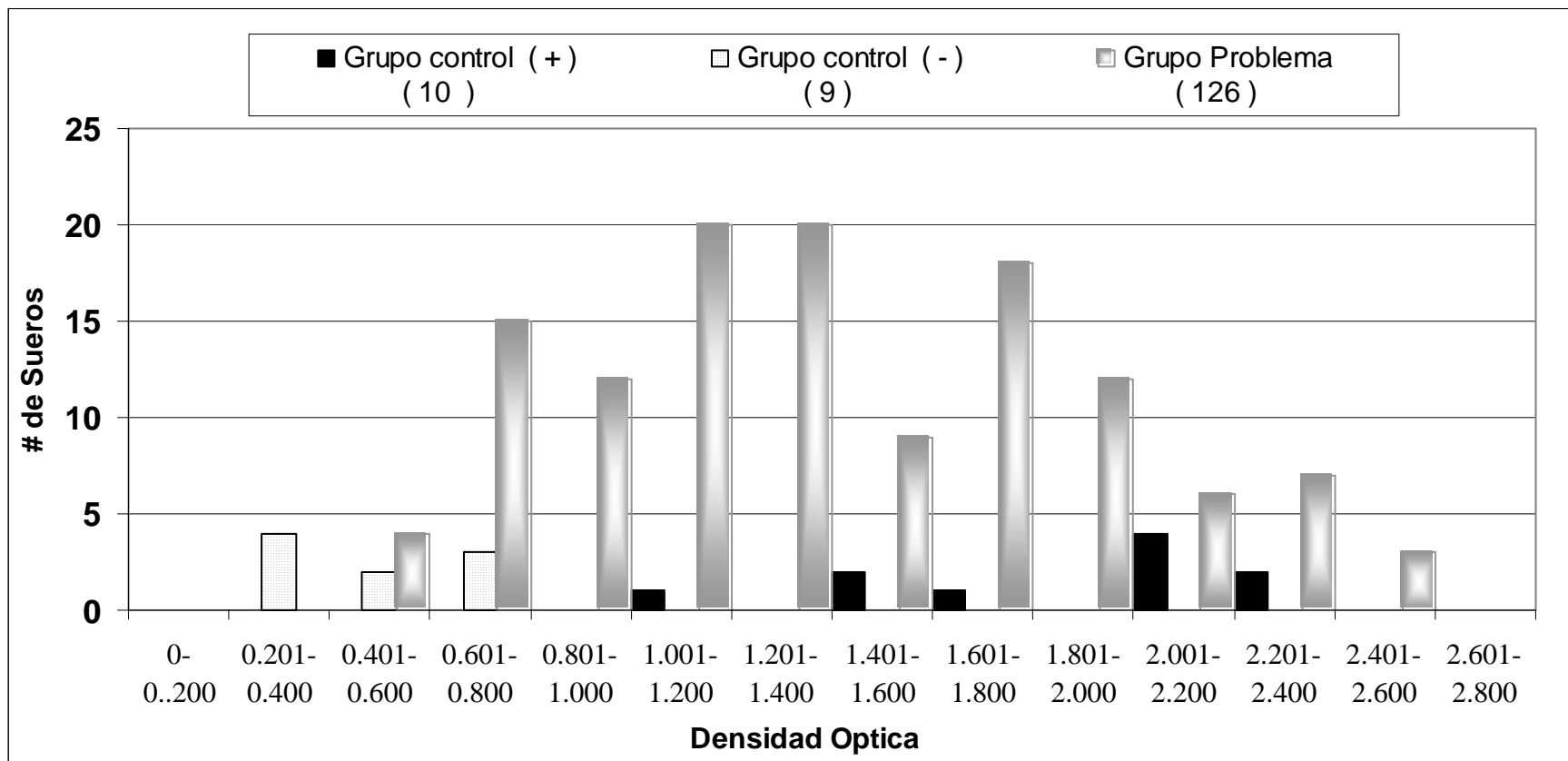


Tabla 1 Resultados de las pruebas serológicas cuando se probaron los sueros de los grupos control positivo, control negativo y problema,

Grupos	# Sueros	RB		ELISA-i		FP		FC	
		Pos. ^a	Neg. ^a	Pos. ^a	Neg. ^a	Pos. ^a	Neg. ^a	Pos. ^a	Neg. ^a
Control Positivo	10	10 (100)	0 (0)	10 (100)	0 (0)	5 (55.5)	4 (44.5)	8 (80.0)	2 (20)
Control Negativo	9	0 (0)	9 (100)	0 (0)	9 (100)	8 (88.8)	1 (11.2)	0 (0)	9 (100)
Problema	126	126 (100)	0 (0)	92 (73.1)	34 (26.9)	114 (90.5)	12 (9.5)	22 (17.5)	104 (82.5)

a = Número, () = porcentaje, RB: Rosa de Bengala, ELISA-i: ELISA indirecta con LPS de la cepa 16M de *Brucella melitensis*, FP: Fluorescencia polarizada, FC: Fijación del complemento.

Resultados del Análisis Estadístico.

Con los resultados obtenidos de la tabla 1, se realizó el análisis estadístico por prueba, para determinar si las pruebas usadas son efectivas y cual es su porcentaje de efectividad, para esto se realizó una tabla de contingencia como se observa a continuación:

<i>Respuesta a la Prueba Tipo de Suero</i>	(+)	(-)	R_i
<i>Suero Problema</i>	$F O$ $F E$	$F O$ $F E$	Σ
<i>Suero Control Positivo (+)</i>	$F O$ $F E$	$F O$ $F E$	Σ
<i>Suero Control Negativo (-)</i>	$F O$ $F E$	$F O$ $F E$	Σ
C_j	Σ	Σ	n

Donde:

$F O$ = El número de sueros en la muestra que caen entre las categorías positivo o negativo.

$F E$ = El número de sueros en la muestra que se esperaba observar y se obtiene con la siguiente formula:

$$F E = \frac{R_i \cdot C_j}{n}$$

Las hipótesis que se establecieron fueron:

Hipótesis Nula (H₀): La respuesta a la prueba es **independiente** del tipo de suero. (La prueba **no** es efectiva)

Hipótesis Alternativa (H₁): La respuesta a la prueba es **dependiente** del tipo de suero. (La prueba **si** es efectiva)

La X² se obtuvo, usando grados de libertad (g.l) con un valor de 2 y un α del 0.05 %, y para obtener este valor se usó la siguiente fórmula.

$$g.l. = (\# \text{ de renglones} - 1) (\# \text{ de columnas} - 1)$$

La X² se obtiene con la siguiente fórmula:

$$X^2 = \sum_i \sum_j \frac{(O_{ij} - e_{ij})^2}{e_{ij}}$$

Donde:

O_{ij}

Son los valores observados (experimentales) en el tipo de suero i-ésimo, con la respuesta a la prueba j-ésima

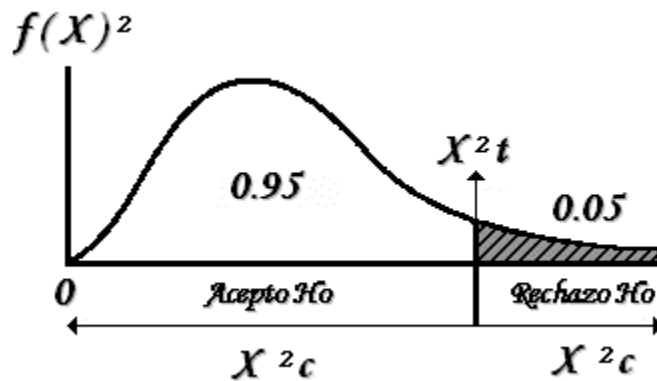
e ij

Son los valores esperados (teóricos) en el tipo de suero i-ésimo, con la respuesta a la prueba j-ésima

Regla de decisión

Si X^2c es $< X^2t$, entonces aceptar H_0 . (La prueba **no** es efectiva)

Si X^2c es $> X^2t$, entonces aceptar H_1 . (La prueba **si** es efectiva)



Distribución de la prueba estadística

Para conocer que tan efectivas fueron las pruebas se utilizó el coeficiente de contingencia (Cc) el cual nos indica el grado de interrelación, asociación o dependencia de las clasificaciones en una tabla de contingencia, cuanto mayor es éste, mayor es el grado de asociación. Tomando a la prueba RB como prueba perfecta por obtener el 100 % de efectividad. La formula usada fue:

$$C_c = \sqrt{\frac{X^2_c}{X^2_c + n}}$$

Los resultados obtenidos de este análisis se pueden observar en la tabla 2, en donde la X^2_c de las pruebas de RB, ELISA-i y FC fueron mayores que la X^2_t , por lo que se aceptó la hipótesis alterna, mostrando ser estadísticamente efectivas con un 100%, 56.8 % y 53.9% de eficiencia respectivamente. Por el contrario la prueba de FP, en donde la X^2_c calculada fue menor que la X^2_t , hizo aceptar la hipótesis nula, no fue estadísticamente efectiva ya que su valores de porcentaje de efectividad fue de 22.2%.

Tabla 2 Comparación del desempeño de las pruebas utilizadas.

Prueba	χ^2_t	χ^2_c	Justificación	Decisión	Efectividad	C_c (% DE EFECTIVIDAD)
RB	5.99	145.14	145.14 > 5.99	Aceptar H_1	SI	0.707 (100%)
ELISA I	5.99	28.01	28.01 > 5.99	Aceptar H_1	SI	0.402 (56.86%)
FC	5.99	24.59	24.59 < 5.99	Aceptar H_1	Si	0.381 (53.93%)
FP	5.99	3.68	3.68 < 5.99	Aceptar H_0	NO	0.157 (22.21%)

C_c = Coeficiente de contingencia

8. DISCUSIÓN

Iniciemos por decir que hasta ahora, no hay una prueba serológica específica para el diagnóstico de la infección por *Brucella melitensis* en ovinos y por ello se ha supuesto ampliamente que las pruebas serológicas usadas para la infección por *B. abortus* en bovinos son también adecuadas para el diagnóstico de *B. melitensis* en ovejas y cabras. (5,9)

Desde el año de 1996 en que se ha implementado y aprobado la prueba de RB al 3% que de forma experimental ha dado resultados de 98% de sensibilidad y una especificidad del 100%, pero al utilizar sueros de animales de zonas endémicas y que no han sido vacunados la sensibilidad baja a 92 % y su especificidad es de 98 % en otro trabajo realizado por Blasco y col. 1994 (8) donde probaron 15 diferentes antígenos usados en la prueba de RB en diferentes países, obtuvieron una especificidad del 100% usando animales de hatos libres, pero cuando probaron animales cultivo negativo de hatos con diferentes condiciones epidemiológicas, la especificidad disminuyó (43-60%), al modificar la proporción suero-antígeno 3:1, para disminuir la concentración celular, algunos antígenos mejoraron su sensibilidad pero no su especificidad.

En base a lo anteriormente citado la prueba de RB es sensible pero poco específica por lo que de los 126 sueros positivos a esta prueba usados en éste trabajo, un porcentaje de ellos fueron falsos positivos lo cual se observa en el resultado obtenido en la prueba de ELISA-i, donde se obtuvo un 26.9 % de animales

negativos que se consideraron como falsos positivos a la prueba de RB debido a que es una prueba más sensible y específica, como lo menciona Nielsen 2002 (22) que dice que el rango de sensibilidad para la ELISA-i es de 92.5 a 100%, en comparación al de la RB que va de 21.0 a 98.3%, ocurriendo algo parecido con la especificidad. En cuanto al grupo de sueros control positivo y negativo dieron el resultado esperado, además de que estadísticamente fue una prueba efectiva.

También concuerda con lo obtenido por Ferreira y col (13) en una evaluación de la prueba de RB usando como antígeno la cepa 99 de *Brucella abortus* y de la prueba de ELISA indirecta usando como antígeno LPS de la cepa 99 de *Brucella abortus*, usando como conjugado Proteína G, en ovejas no vacunadas y con un estatus bacteriológico conocido y su eficacia diagnóstica fue comparada con RB y FC, mostrando todas las pruebas una especificidad del 100% al probar un total de 212 ovejas libres de *Brucella*, al probar 219 ovejas cultivo positivo a *Brucella melitensis* ambas la RB y ELISA-i fueron más sensibles (98.6 y 96.8% respectivamente) que la FC (92.7) los resultados fueron similares cuando se probó el grupo de sueros de 181 animales de rebaños infectados y bacteriológicamente negativos.

No obstante, por lo observado en éste estudio y en los trabajos antes citados el manual de diagnóstico de la OIE, menciona que la prueba de ELISA debiera ser considerada más como una prueba “tamiz” que como una prueba confirmatoria sobre todo al probar animales vacunados o rebaños afectados por problemas de reacciones falsas positivas. (25)

La FC se ha usado como prueba confirmatoria por su especificidad del 100%, por lo que los sueros positivos a RB deben ser confirmados con FC, para descartar los animales falsos positivos dados por RB. En la prueba de FC solamente resultaron positivos 17.5% de nuestros sueros problema, lo que indica posibles fallas en la técnica, aunque estadísticamente si fue significativa, considerando como positivos aquellos sueros que mostraran un 50% de hemólisis a una dilución igual o mayor a 1/4, este resultado se aleja de lo esperado, es decir que tuviera un desempeño similar a la prueba de ELISA-i como se ha reportado en otros estudios (18, 22,13)

El no obtener el desempeño esperado por FC en éste trabajo, nos lleva a suponer que se presentó uno de los problemas que se han observado y es que sueros que son negativos a FC resultan positivos a RB (8). Cuando se prueba un número limitado de sueros obtenidos de *B. melitensis* cultivo positivo y animales libres de *Brucella*, la prueba de FC, provee la misma sensibilidad que la prueba de RB y la prueba de ELISA i, sin embargo, cuando es probada en ovinos en condiciones de campo la sensibilidad ha sido baja (88.6%) en comparación a RB (92.1%) y ELISA i (100%). (14) Sin embargo, en éste estudio se obtuvo solamente el 17.5 % de efectividad para la prueba de FC.

La prueba de FC a parte de ser compleja, tener variabilidad en los reactivos y un aspecto importante es que los sueros probados presenten actividad anticomplementaria, como lo observado en un estudio en donde muestrearon 2,235 ovejas de 14 hatos, obteniendo el 4.7% de animales positivos a RB presentaron esta reacción (18). Este fenómeno se presentó en una muestra de suero control positivo (con aislamiento positivo), de éste trabajo, ésta reacción consiste en la ausencia de

hemólisis completa en el suero control anticomplementario en el tubo, indicando que el suero bajo prueba tiene una actividad no específica anti-complemento.

La prueba de Fluorescencia Polarizada es una prueba nueva para el diagnóstico serológico por la infección de *Brucella spp* en animales, además de que ya ha sido validada para el diagnóstico de la infección por *B. melitensis* en ovinos, uno de los estudios más recientes fué el realizado por Minas y col en 2005 (18), partiendo de 116 sueros de ovejas infectadas naturalmente (verificadas por cultivo) y 851 muestras de animales sanos (criados en áreas donde *B. melitensis* nunca ha sido aislada) obteniendo 87 mP como el valor óptimo de punto de corte que ofreció la más alta sensibilidad y especificidad calculada en 97.6 y 98.9 % respectivamente, cuando se evaluó usando un grupo de 587 sueros de animales criados en rebaños infectados que resultaron positivos al menos en dos pruebas usadas para el diagnóstico de *B. melitensis* en ovinos (RB, FC, ELISA-i y ELISA-c), ofreció una sensibilidad de 95.9% y la especificidad permaneció igual. Con lo cual concluyeron y además es sustentado por otros autores en que es una prueba experimental promisoría, que ofrece un desempeño semejante a la prueba de ELISA-i, otras ventajas que ofrece son: su simplicidad, el corto tiempo en que los resultados pueden ser obtenidos (2-5 min), capaz de discriminar resultados positivos debidos a la vacunación y el punto de corte puede ser ajustado a diferentes situaciones epidemiológicas (22, 14, 29)

Por el contrario, en este trabajo la FP mostró ser la única prueba que no fue efectiva estadísticamente debido al resultado obtenido en los grupos control positivo y negativo, como se menciona anteriormente el punto de corte puede ser ajustado y ha

sido establecido en otros estudios a 78, 87, 88, 89 mP, (18, 29) ,el punto de corte empleado en este trabajo fue de 78 mP establecido por medio del análisis ROC realizado por el Dr. Ramírez Pfeiffer y al tratar de usar puntos de corte antes mencionados, no se observo algún cambio favorable en el desempeño de esta prueba.

Los factores claves que pudieron haber interferido con los valores obtenidos de mP es que los reactivos son afectados por la temperatura ya que a mayor temperatura los valores de mP disminuyen, así como la temperatura en la cámara de lectura, es decir, en el tiempo de relajación de la molécula. (19)

Algo muy importante que afecta no solo a esta prueba sino que a todas las pruebas usadas es el hecho de que los animales positivos resultado de un aislamiento no representan todos los estadios de la enfermedad (periodo de latencia, incubación y cronicidad), por lo que los resultados de estas pruebas obtenidos de estos animales, cuando se prueba en condiciones de campo las pruebas no alcanzan los niveles tan altos de sensibilidad y especificidad que se observan en los estudios aislados, esto se refleja en el estudio realizado en México por Pfeiffer y col 2005 (29) en el cual obtuvieron una sensibilidad de 83.5% y una especificidad de 82.5% en la prueba de FP usada en cabras.

9 CONCLUSIONES

La prueba de RB no es suficiente como prueba única para el diagnóstico de brucelosis ovina causada por brucelas lisas.

La prueba de ELISA-i usando como antígeno LPS de la cepa 16M de *Brucella melitensis* podría ser incluida en el panel de pruebas autorizadas para el diagnóstico en ovinos como una prueba tamiz.

La prueba de FC es una prueba confirmatoria útil para el diagnóstico individual en ovinos.

La prueba de Fluorescencia Polarizada es una prueba promisoría que requiere de más ensayos en ovinos para poder ser implementada.

10 LITERATURA CITADA.

1. Álvarez P.E. Situación de la brucelosis en América: Panorama General. En: Díaz-Aparicio E, Hernández-Andrade L, Valero-Elizondo G, Arellano-Reynoso B. Diagnóstico de Brucelosis. INIFAP, SAGAR. México. 2001: 9-16
2. Acha N.P, Szifres B. Zoonosis y Enfermedades Comunes al hombre y a los animales. 3ª edición. Vol. I. Organización Panamericana de la Salud. 2001
3. Aréstegui M.B, Gualtieri S.C, Domínguez J, Scharovsky O.G. El género *Brucella* y su interacción con el sistema mononuclear fagocítico. Veterinaria México. 2001; 32: 131-139
4. Basil G.D, Scout E, Ovit S, Huang L.Y, Zaitseva Y, Lapham C, Eller N, Holding H. Review: Immunity and protection against *B. abortus*. Microbes and infection 2001; 3: 43 - 48
5. Bastuji B.G, Blasco J.M, Grayón M, Verger J.M. *Brucella melitensis* infection in sheep: present and future. Veterinary Research. 1998: 255 - 274.
6. Bautista O.M, Ochoa D.V. Técnicas de Inmunoensayo Ligadas a Enzimas: En: Díaz-Aparicio E, Hernández-Andrade L, Valero-Elizondo G, Arellano-Reynoso B. Diagnóstico de Brucelosis. INIFAP, SAGAR. México. 2001: 92 - 95

7. Blasco J.M Control de la Brucelosis Ovina. 1 - 6
8. Blasco J.M, Garin-Bastuji B, Marin C.M, Gerbier G, Fanlo J, Jiménez de Bagués M.P, Cau C. Efficacy of different Rose Bengal and Complement Fixation antigens for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. The Veterinary Record. 1994: 415 - 419
9. Crespo L.F. Brucelosis Ovina y Caprina. Office Internacional des Epizooties, 1994
10. Cobos M.L, Peña F.G.P, Romero R.C, Velázquez Q.F, Velázquez S.M.M, Vicencio M.M.A, Villa S.J.J, Luna M.J.E, Mateos P.A, Betancourt M.X. Fijación del Complemento En: Díaz-Aparicio E, Hernández-Andrade L, Valero-Elizondo G, Arellano-Reynoso B. Diagnóstico de Brucelosis. INIFAP, SAGAR. México. 2001: 56 - 79
11. Daniel W.W. Bioestadística. Editorial Limusa Wiley 4ª Edición 2004: 571 - 575
12. Díaz A.E, Suárez G.F. Diagnóstico de Brucelosis. Curso de capacitación de coordinadores estatales y supervisores distritales en Tuberculosis bovina y Brucelosis. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. México. 1995: 221 - 224

13. Ferreira A.C, Cardoso R, Travasso D.I, Mariano I, Belo A, Rolao P.I, Mantengas A, Piña F.A, Correa De Sa M. I. Evaluation of a modified Rose Bengal test and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. Vet. Res. 2003: 297 - 305
14. Garin-Bastiji B, Blasco J.M, Marín C, Albert D. The diagnosis of brucellosis in sheep and goats, old and news tools. Small ruminant Reseach 2006: 63 - 70
15. Luna M.J.E, Mejia T.C. Brucellosis in México: Current status and Trends. Veterinary Microbiology 2004: 621 - 630
16. Mancera M.A Prueba del antígeno brucelar amortiguado o de tarjeta. En: Díaz-Aparicio E, Hernández-Andrade L, Valero-Elizondo G, Arellano-Reynoso B. Diagnóstico de Brucelosis. INIFAP, SAGAR. México. 2001: 80 - 81
17. Marín A.C.M, Blasco M.J.M. Diagnóstico Bacteriológico de la Brucelosis Animal. En: Díaz-Aparicio E, Hernández-Andrade L, Valero-Elizondo G, Arellano-Reynoso B. Diagnóstico de Brucelosis. INIFAP, SAGAR. México. 2001: 47
18. Minas A. et.al. Validation of fluorescence polarization assay (FPA) and comparision with other tests used for diagnosis of *B. melitensis* infection in sheep. Veterinary Microbiology. 2005: 211 - 221

19. Minas A. et.al. Validation of fluorescence polarization assay (FPA) performed in microplates and comparison with other tests used for diagnosing *B. melitensis* infection in sheep and goats. *Journal of Immunological Methods* XX 2007: 1 -10
20. Moriyón I, López-Goñi. Estructura, genética y fisiología del género *Brucella*. En: Díaz-Aparicio E, Hernández-Andrade L, Valero-Elizondo G, Arellano-Reynoso B. *Diagnóstico de Brucelosis*. INIFAP, SAGAR. México. 2001:17 – 27
21. Nielsen K, Duncan RJ. *Animal Brucellosis*. CRC Press. Boston 1990:160
22. Nielsen K. Diagnosis of Brucellosis by serology. *Veterinary Microbiology*. 2002: 447 - 459.
23. Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales.
24. OIE Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial animals (mammals, birds and bees) caprine and ovine brucellosis Fifth Edition. Volume I. 2004
25. OIE Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial animals (mammals, birds and bees) bovine brucellosis Fifth Edition. Volume I. 2004
26. Olsen S. C, Thoen C.O, Chenville N. F. En: Gyles C L, Prescott J. F, Songer J. G, Thoen C. O. *Brucella*. Blackwell Publishing third Edition 2004: 309- 316

27. Ottom R. Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. Novena Edición. Vol. I. Mc Graw Hill Interamericana. 2002
28. Ramírez P.C. Diagnóstico de brucelosis bovina por medio de fluorescencia polarizada: En: Díaz-Aparicio E, Hernández-Andrade L, Valero-Elizondo G, Arellano-Reynoso B. Diagnóstico de Brucelosis. INIFAP, SAGAR. México. 2001: 103 - 105
29. Ramírez P.C, Nielsen K, Marín R.F, Rodríguez P.C, Gomez F.R. Comparison of Fluorescence Polarization assay with Card and Complement Fixation tests for the diagnosis of goat brucellosis in a high prevalence area. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. XXX. 2005:1 - 7
30. Rojas E.O. Inmunología de memoria. 2ª Edición. 2004
31. Saldarriaga D.A, Ossa J.E, Rugeles M.T. Respuesta inmune y estrategias de evasión durante la infección con *Brucella spp.* *Revista Colombiana Ciencias Pecuarias*. 2002. 15:2 180 - 186
32. Sánchez C.Y, Piedra P.L, González S.M.A. *Brucella abortus*. Inmunología de *Brucella abortus* (Citada 1998 Nov. 24) Disponible en: <http://intramed.uam.mx/brucc/content.htm>

11 ANEXOS

1. Solución Amortiguadora de Fosfatos 10 mM pH 7.2 (PBS)

Para un litro de solución pesar:

Cloruro de Sodio	8 g
Cloruro de Potasio	1.2 g
Fosfato Dibásico de Sodio	1.44 g
Fosfato Monobásico de Potasio	1.024 g

Lo anterior se vacía en una botella de vidrio limpia y seca, se afora con un litro de agua destilada y se mantiene en agitación por 15 minutos.

2. PBS Tween 20

Para 1000 ml de PBS se agregaron 0.5 ml de Tween 20 y se homogeniza.

3. Antígeno para ELISA-I

Se utilizó LPS de *Brucella melitensis* 16 M liofilizado a una concentración de 2.5 µg por 1 ml de agua destilada.