



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "CUAUTITLAN"

**DETERMINACION DE AGLUTININAS CONTRA
BRUCELLAS EN EQUINOS DEL RASTRO DE
IZTAPALAPA POR MEDIO DE PRUEBAS
SEROLOGICAS**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
ENRIQUE LONA PIMENTEL

Asesor: José Rojo López

Cuautitlán Izcalli, México

1985



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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

I N D I C E

1) RESUMEN	1
2) INTRODUCCION	2
3) GENERALIDADES DE LA ENFERMEDAD	5
4) OBJETIVOS	16
5) MATERIAL Y METODOS	17
6) RESULTADOS	27
7) DISCUSION	32
8) CONCLUSIONES	35
9) SUGERENCIAS	36
10) BIBLIOGRAFIA	37

R E S U M E N

El trabajo realizado en éste estudio serológico, se hizo en equinos destinados a sacrificio en el rastro de Iztapalapa, para tratar de determinar la presencia de aglutininas contra Brucella. Se tomaron 500 muestras de sangre al azar de diferentes equinos, de los cuales se obtuvieron 500 muestras de suero, que se estudiaron en el laboratorio de la F.E.S.-C. mediante 3 pruebas serológicas de aglutinación para el diagnóstico de Brucelosis: Prueba en placa, -- prueba en tarjeta y prueba en tubo.

La prueba en placa demostró 43 reactores positivos, la de tubo 32 positivos y la de tarjetas 30 muestras positivas, siendo la prueba en placa la que detectó un mayor número de reactores positivos.

Se concluye que en el rastro de Iztapalapa se ha determinado la presencia de aglutininas en contra de Brucella de equinos sacrificados en este lugar.

Se sugiere que se realicen estudios periódicos en esta especie, ya que la Brucelosis esta tomando una amplia -- distribución en nuestro país, y los equinos parecen ser foco importante de infección y diseminación de la enfermedad.

I N T R O D U C C I O N

La Brucelosis es una enfermedad ampliamente distribuida, posee enorme importancia económica en casi todo el mundo, sobre todo en ganado lechero, la frecuencia varía considerablemente en distintas regiones y en diferentes países. (2,21)

En México, la Brucelosis es la zoonosis más importante. La importancia de ésta enfermedad, radica en la facilidad con que se transmite la infección de los animales al hombre. (10)

La transmisión en los humanos ha sido por ingestión de carne infectada, leche y otros productos y por contacto con material infectado. En el hombre esta enfermedad es llamada: fiebre de malta, fiebre ondulante y Brucelosis. Produce una fase septicémica aguda, seguida por un estadio crónico que se prolonga por muchos años y llega a afectar diversos tejidos. (8,13,18)

Existen también muchos problemas de repercusión económica, ya que hay pérdidas y dificultades en los planes de crianza, además produce frecuentemente infertilidad permanente o pasajera como secuela, afectando a todas las especies domésticas. (2)

La prevalencia de Brucelosis equina ha sido menos estudiada en comparación a otras especies animales, pero en to

dos los reportes de estudios sobre esta enfermedad en equinos, se ha demostrado la presencia de anticuerpos que dan lugar a reacciones de aglutinación. (4,22)

La Brucella abortus, rara vez produce aborto en las yeguas, los casos clínicos de Brucelosis se asocian con infecciones de la bursa, mal de la cruz y fístula de la nuca o talpa. (9,22). También en las artritis supurativas, especialmente en la articulación de la rótula, se ha aislado, aunque no se ha demostrado que sea la causa de las alteraciones supurativas. (21)

Stableforth y Galloway describieron subclínicamente, la infección localizada de bursa, articulaciones y vainas tendinosas, causadas predominantemente por Brucella abortus, mientras Fitch y Polding han registrado casos de Brucella suis y Brucella melitensis en caballos respectivamente. (22)

Tanto Brucella abortus como Brucella suis se encuentran regularmente en las lesiones bursales (mal de la cruz y fístula de la nuca) que son las 2 formas de bursitis más importantes en équinos. (9,25)

La Brucella suele encontrarse también junto con Actinomyces bovis en los trayectos fistulosos y úlceras de la nuca y problemas crónicos donde se halla seguramente en calidad de invasor secundario y no de patógeno primario. Hay otras comunicaciones aisladas, sobre lesiones

esqueléticas o sinoviales supurativas en los équidos producidos por estos microorganismos. (9)

La infección por cualquiera de los microorganismos del género *Brucella* es al menos, inicialmente sistémica con fases bacterémicas recidivantes bien determinadas en las infecciones persistentes. (2,9.25)

En la actualidad disponemos de pruebas serológicas para la identificación de aglutininas, contra Brucelosis en sueros sanguíneos y leche. (13)

Para obtener resultados fidedignos y uniformes, se necesita realizar las pruebas según un método estándar e interpretarlos de acuerdo a éstos, y empleando siempre un antígeno que ha sido estandarizado de acuerdo a las recomendaciones de los Congresos Interamericanos de Brucelosis, y -- que conforman a su vez el estándar Internacional establecido por la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.), la Organización para la Agricultura y la Alimentación (F.A.O.) y la Oficina Internacional de Epizootias (O.I.E.). (11,13)

La importancia de realizar un exámen serológico en varias especies incluyendo a los equinos, es necesario para el control de esta enfermedad. Estudios epizootiológicos continuos en equinos, para determinar la prevalencia de la enfermedad y el foco de infección en esta especie es importante. (17,22)

GENERALIDADES DE LA ENFERMEDAD

Las Brucellas se conocen desde 1887, cuando Bruce -- aisló e identificó por primera vez la Brucella melitensis. -- Por muchos años el género Brucella estuvo compuesto por 3 -- especies: Br. melitensis, Br. suis y Br. abortus, en la actualidad se conocen otras 3 especies: Br. neotomas, Br. -- ovis y Br. canis, las 4 primeras especies conocidas se distinguen en forma lisa y las últimas 2 en forma rugosa. (6,8)

- 1887 - Descubrimiento por Bruce en el hombre y en la cabra de Br. melitensis.
- 1897 - Aislamiento por Bang de la Brucella de su nombre -- (Br. abortus)
- 1914 - Descubrimiento por Traum de la Br. suis.
- 1918 - Alice Evans comprueba la relación de parentesco entre estos microorganismos. (6)

A la enfermedad se le conoce con las siguientes sinónimas: Enfermedad de Bang, Aborto contagioso, Aborto epizootico, Mal de la cruz y Brucelosis más específicamente. -- (2,7)

La Brucelosis es una enfermedad infecciosa aguda o -- crónica típicamente manifestada por aborto del ganado, bovino, porcino, equino, caprino y de otras especies. Casi todas las especies domésticas son susceptibles a la enfermedad y se dan frecuentemente infecciones cruzadas. Se distin

guen en general por cultivos y pruebas bioquímicas pero - principalmente por procedimientos serológicos. (2,8.9)

Al principio de la enfermedad, aparecen los anticuerpos aglutinantes IgM, que se sintetizan primero como respuesta al estímulo antigénico. La velocidad de síntesis es alrededor de 8 mg/Kg/día y tiene una vida media de aproximadamente 5 días, peso molecular de 900,000. Un poco más tarde de la infección aparecen los anticuerpos precipitantes - IgG, éstos constituyen alrededor del 85% de las inmunoglobulinas presentes en el suero de la mayoría de individuos normales o hiperinmunes, su peso molecular, es de 150,000, y su vida media en el suero es de 23 días. Los anticuerpos - IgM pueden persistir después de la recuperación. (2,4,8)

Características de la bacteria:

Las Brucellas son pequeños cocobacilos Gram -, a menudo se tiñen irregularmente, inmóviles no esporulados, y con relativa inactividad metabólica, siendo característica su localización intracelular, miden 0.5 micras de grosor, por 0.6 a 3 micras de longitud. (8,15) Las Brucellas son germen aerobios estrictos, algunos de ellos necesitan que se añada CO₂ a la atmósfera de incubación en proporción del 5 al 10% durante el aislamiento inicial. (6,7)

En medios enriquecidos después de las 24 horas a 48 horas de incubación, se presentan colonias pequeñas, conve-

xas y lisas, al principio son traslúcidas después se vuelven parduzcas. (8) Para identificar colonias en crecimiento el método más apropiado es la siembra directa en un medio sólido propio para el aislamiento primario. (3) Algunas cepas han sido cultivadas en medios sintéticos compuestos por 18 aminoácidos, vitaminas, sales y glucosa. Los productos patológicos recientemente obtenidos de fuentes animales o humanas, se inoculan generalmente en gelosa soja, tripticasa o gelosa infusión de hígado. (8,19)

En la superficie de las Brucellas lisas se encontraron 2 antígenos primordiales y se denominaron: A y M; son lipopolisacáridos, con algunas cantidades de polipéptidos, poseen características endotóxicas parecidas a las de las enterobacterias. El fragmento lipídico denominado A, que es el responsable de la toxicidad y el polipéptido parece ser esencial en la inducción de hipersensibilidad retardada en animales sensibles, mientras que el componente polisacárido es responsable de la especificidad serológica porque posee la mayor actividad antigénica.

Las cepas rugosas no poseen la endotoxina de tipo polisacárido, asociada con la actividad aglutinogénica de las colonias lisas. (4,6,8)

- Br. melitensis - afecta ovinos y caprinos, pero puede infectar a bovinos y al hombre, es la causa principal de zoonosis.

- Br. suis - Afecta a cerdos, puede infectar liebre y otras especies, incluyendo al hombre.
- Br. abortus - Patógeno a bovinos, puede infectar a otras especies incluyendo al hombre.
- Br. neotomae - Parásito del neotoma lépida (rta del desierto).
- Br. ovis - Se encuentra en forma rugosa, produce epididimitis del carnero.
- Br. canis - Patógena para el perro no posee antígeno A y M. (6)

La transmisión de la enfermedad es por ingestión, penetración de la conjuntiva, piel indemne y contaminación de la ubre durante el ordeño, soluciones de continuidad, inseminación artificial con semen infectado, los animales nunca sanan y quedan como portadores. (2,21) La ingestión de pastos u otros alimentos contaminados por secreción de animales enfermos es el método más frecuente de propagación. (2)

La transmisión por vía digestiva es posible aunque existan enzimas digestivas y sales biliares, porque permite acceso directo por vía oral. (15)

Los caballos infectados especialmente aquellos que padecen trayectos fistulosos en la cruz e hígrómas, pueden contaminar el pasto por la eliminación de microorganismos en las secreciones o en las heces. (2,5,21)

Se observa la concentración de Br. abortus más elevada en el contenido del útero gestante, en el feto y membrana fetales, siendo las fuentes más importantes de infección. (2,19,21)

La Br. abortus tiene predilección por testículos, útero grávido, ubres, glándulas sexuales masculinas accesorias, cápsulas articulares, bolsas y ganglios linfáticos, hígado, vainas tendinosas y médula ósea. (9) Las membranas fetales de muchos animales contienen eritritol, un factor de crecimiento para las Brucellas. El aborto suele producirse hacia los 3 últimos meses de la gestación. (2,9,21).

En equinos la presencia de Brucella abortus suele coincidir con la aparición de tumefacciones bursales crónicas en el cuello y cruz, lo que se ha identificado también como causa de aborto en una yegua. Cuando los caballos conviven con bovinos infectados, una proporción elevada de equinos puede infectarse y desarrollar reacción positiva a las pruebas de aglutinación en el suero. (2,7,25)

Algunos caballos padecen infección generalizada con signos clínicos que incluyen rigidez generalizada, temperatura fluctuante, letárgia y decaimiento general principalmente, desarrollo de abscesos que se localizan en bursa, tendones, músculos y articulaciones haciéndose aparentes con mayor frecuencia a nivel de las vértebras cervicales, en la región de la cruz, en cuadros crónicos produce osteomielítis, osteoartrítis vertebral y cojera. (2,6,7,25).

Cuando la infección se localiza en útero las Brucellas están en los extremos de las vellosidades uterinas, dentro del placentoma produce una inflamación con gran infiltración de células leucocitarias y exudados, posterior-

mente las vellosidades se tornan edematosas y necróticas, - afectando a los tejidos adyacentes.(6)

Estudios sobre la prevalencia de la Brucelosis equina han demostrado casos clínicos de ésta enfermedad asociados con la infección de bursa, fístula de la cruz y raramente - han sido reportados abortos en caballos. (6,21) (5,22)

En vista del conocimiento de la existencia de la infección de *Brucella* en bovinos, cerdos, ovejas y cabras, en la India, se hizo un estudio serológico y se demostró la -- presencia de *Brucella* en caballos, mediante pruebas de aglutinación en tubo e inactivación por calor de acuerdo a los métodos descritos por Alton y Jones, y Amerault. (22)

Otro estudio realizado en sueros por precipitación de anticuerpos de equinos en la India demostró, también la prevalencia de la enfermedad, de un total de 112 muestras, 57 -- positivas, reaccionaron en la prueba de precipitación en -- gel, dando 1-3 líneas precipitantes con antígeno HSWS (calor estable y agua soluble) preparado de células de Brucella abortus. (23)

Es evidente que la Brucelosis ocurre en ambos sexos, en el macho el microorganismo se localiza principalmente en heridas, articulaciones, nódulos linfáticos y la diseminación puede ocurrir a través del coito por semen infectado. -- Aunque los casos clínicos son raros, pero los organismos de *Brucella* han sido aislados de varias condiciones: mal de la cabeza, mal de la cruz y abortos en yeguas. Mexer reportó - varios de estos casos en caballos de California (U.S.A.). - (22).

Roderick, Kimball, Mo Leod y Franck aislaron Actinomyces bovis, Br. abortus y Br. suis de las lesiones de un gran número de casos, de procesos fistulosos de la cruz y de problemas de articulaciones. La inyección de cultivos combinados de A. bovis con Br. abortus y Br. suis dentro de la bursa supraespinosa de caballos produjo una bursitis idéntica a la de los casos clínicos que todos ellos estudiaron. (13)

Rojo en 1973, efectuó un estudio serológico de Bruceosis en equinos de México, efectuando 5 pruebas serológicas, en 11 estados de la República, demostrando la presencia de la enfermedad y sugirió su distribución y amplia prevalencia en el país. (20)

En Texas (U.S.A.) se hizo otro estudio realizando aislamiento de Biotipo 4 de Brucella abortus de un caballo de 11 años de edad y castrado. El aislamiento fué obtenido de una inflamación sobre el lado de la cruz del caballo, el exudado fué espeso, con material sanguinolento, el cultivo fué de rutina, aeróbica y anaeróbica en agar sangre de bovino sin crecimiento después de la incubación por 48 hrs. a 37°C, sin embargo colonias pequeñas fueron observadas en agar triptosa modificado en placa de Farrek, incubadas por 5 días a 37°C. (26)

Las pruebas disponibles para el diagnóstico de Bruceosis son:

1) En suero sanguíneo :

a) Aglutinación : En tubo (lenta), Placa (rápida), prueba de Coombs, tarjeta, hemoaglutinación, inactivación por calor, rosa de bengala, mercaptoetanol, rivanol y antígeno acidificado.

b) Fluorescencia indirecta.

c) Fijación de complemento.

d) Prueba de ELISA (Enzima conjugada con innoabsorbentes) o ELA (Anticuerpo conjugado con la enzima).

e) Precipitación: Difusión en gel, radioinmuno ensayo.

2) En leche: Prueba de anillo (por hatos o individual), sueroaglutinación, placa o tubo, anti-globulina de Coombs y fijación de complemento.

3) Determinación de anticuerpos: Moco vaginal, plasma seminal y anticuerpos fluorescentes.

- 4) Determinación bacteriológica: Feto, tracto reproductor, glándula mamaria y tejidos óseos. (2,8,16)

Los análisis para el diagnóstico clínico o de laboratorio se basan en pruebas de aislamiento de la Brucella (cultivo o inoculación a cobayo, biopsia de órganos y tejidos), y presencia de aglutininas contra Brucella abortus, en sueros sanguíneos, leche, moco vaginal, suero lácteo y plasma seminal. (2,8) En animales sacrificados, las muestras para aislamiento y cultivo se pueden tomar de leche, exudado vaginal, productos de aborto (feto, y membranas fetales), sangre, gánglios linfáticos (submaxilares y supramarios), hígado, glándula mamaria y bazo. En machos: testículos, epidídimo y vesículas seminales. (1)

El diagnóstico serológico se describe por varios autores, pero desafortunadamente, no hay un criterio definido en la interpretación de resultados, por ejemplo: algunos autores mencionan, títulos de aglutinación mayores a 1:200, son positivos, otros indican que títulos de 1:40, son indicativos de infección. (6)

En un estudio serológico sobre la prevalencia de Brucelosis equina en la India, las muestras fueron probadas -- por standards de aglutinación en tubo y pruebas de inactivación por calor, se comprobó la sensibilidad y especificidad

de ambas pruebas. Considerando los valores comparativos de las 2 pruebas serológicas de la de aglutinación en tubo, -- aunque es altamente sensible, fué menos específica porque -- muchos reactores de ésta prueba fueron negativos a la de -- inactivación por calor, que fué más específica pero menos -- sensible. Sugieren que en equinos una combinación de ambas pruebas podra dar una información más real. (22)

Las medidas higiénicas para controlar y tratar de erradicar, incluyen básicamente, el aislamiento o eliminación de animales infectados, la destrucción de placentas, -- secreciones uterinas y fetos abortados, la desinfección de -- locales contaminados y en bovinos la vacunación. Todos los equinos, cerdos, bovinos, ovejas y cabras de nuevo ingreso -- deben ser sometidos a pruebas correspondientes y aislados -- durante 30 días y vueltos a probar. (2)

Un estudio en la India demostró en sus resultados, -- que los equinos criados en caballerizas tuvieron más número de reactores positivos, que los que se usan para propósitos diferentes, lo cual fué altamente significativo, porque de -- mostraron que los focos de infección permanecen en las caba -- llerizas y de ahí son diseminados de un animal a otro. (22)

Algunos equinos con fístula de la cruz y pruebas de -- aglutinación sérica positiva suelen ser tratados por vacuna -- ción con Brucella abortus cepa 19: se administran 3 inyec -- ciones con 10 días de intervalo entre cada una. En Inglate -- rra se emplea una vacuna equina, para Brucelosis. (2,13)

Desde el punto de vista de Salud Pública la Brucelosis es importante, por que produce fiebre ondulante (fiebre de malta) en el hombre, que se caracteriza por una fase -- septicémica aguda, seguida por un estadio crónico que se -- prolonga por muchos años afectando diversos tejidos. La ma yor parte en el hombre son de tipo ocupacional y se obser-- van en Granjeros, Veterinarios, Tablajeros y Carniceros. Un gran motivo de exposición es el hecho de manipular cadáve-- res de animales infectados, asi como la ingestión de leche_ sin hervir y productos lácteos, asi como la exposición con_ exudados de la fístula. La importancia de la enfermedad en el hombre justifica ampliamente la erradicación de la enfer_ medad. (1,2,8,9,18).

O B J E T I V O S

Los objetivos de éste estudio serológico es la determinación de aglutininas contra Brucella, en pruebas de suero sanguíneo en equinos destinados a sacrificio, del rastro de Iztapalapa, mediante las pruebas de aglutinación en placa (rápida), Tubo (lenta) y la de tarjeta; utilizando antí-geno de Brucella abortus cepa 19 (Pro-NaBiVe). También se pretende demostrar la prevalencia de la enfermedad, como foco de infección en el rastro, y observar el comportamiento de las muestras recolectadas en cada una de las pruebas.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

Se procesaron 500 sueros sanguíneos de equinos del Rastro de Iztapalapa. Las muestras se tomaban al momento del sacrificio. Los animales eran insensibilizados con pístola de diavolos, posteriormente eran desangrados por vía yugular, en ese momento se tomaba la muestra en frascos limpios, que se dejaban reposar para la obtención de cada muestra individual de suero, ya obtenido este se mantuvo en congelación hasta el momento de realizar la prueba.

Cada muestra de suero fué analizada por 3 pruebas serológicas usadas para el diagnóstico de Brucelosis:

- 1) Aglutinación en Placa.
- 2) Aglutinación en tubo.
- 3) Prueba de la Tarjeta.

Todas las pruebas se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de la F.E.S.-Cuautitlan de la U.N.A.M.

Las técnicas y métodos usados para cada prueba serológica fueron las siguientes:

- 1) PRUEBA DE AGLUTINACION EN PLACA.

Material y Reactivos:

- a) Placa de cristal cuadrículada de 3 cm. por lado.
- b) Antígeno de Brucella abortus (cepa 1119-3) el-

borado en México por: Productos Nacionales Biológicos Veterinarios (ProNaBiVe) para la prueba en placa, mantenido en refrigeración.

c) Caja oscura con fuente de luz propia, con cubierta de cristal, para realizar las lecturas.

d) Gotero estandar que deposita una gota de antígeno que equivale a 0.03 ml.

e) Pipetas serológicas de Bang graduadas en 0.08, 0.04, 0.02 y 0.005 ml.

f) Palillos de madera.

Método:

Se saca el suero del congelador a temperatura ambiente durante 1 hr. aproximadamente, el antígeno también se saca del refrigerador a temperatura ambiente, unos 20 min. antes de iniciar la prueba. Se llena la pipeta de Bang con suero y se iguala la marca de 0.08 ml. se limpia la pipeta con papel absorbente, y se deposita la cantidad de 0.08 ml. en el centro del primer cuadro de la placa de cristal, manteniendo la pipeta en un ángulo de 45° , y así sucesivamente se depositan en el centro de cada cuadro las siguientes cantidades: 0.04, 0.02, y 0.01 ml, que son las 4 diluciones usadas en ésta prueba y que equivalen a títulos de: 1/25, 1/50, 1/100, y 1/200 respectivamente.

Con el gotero estandar se toma una determinada cantidad de antígeno, que se agita antes de ser usado para homogenizarlo, y se deposita una gota (0.03 ml) de antígeno en cada una de las diluciones. Con el palillo de madera se mezcla en forma rotatoria la combinación de suero antígeno empezando con la dilución más alta, hacia la más baja. Se usa un palillo diferente para cada muestra.

Se toma la placa y se mueve en forma rotatoria durante 30 segundos, con mucho cuidado, sin mucha fuerza, para mantener en el centro de la mezcla de suero antígeno evitando que esta salga del cuadro y se mezcle con la de otro cuadro, posteriormente se deja reposar durante 8 minutos, moviendola con intervalos de 4 minutos, y se efectúa la lectura en la caja obscura con fuente de luz propia.

Interpretación de la reacción :

La reacción de aglutinación es dada por la concentración de anticuerpos contra Brucella que existen en el suero.

Los anticuerpos forman puentes específicos entre la superficie celular bacteriana, aglutinando de esta manera a las bacterias, dando lugar a la formación de grumos en pruebas positivas. (4)

Para interpretar la lectura de la reacción se tomó el siguiente criterio:

...

1) Una reacción positiva, es aquella, en la cual, la mezcla suero-antígeno presenta la formación de pequeños grupos que dan la impresión de que la mezcla tuviera arena finísima, que al mover la placa rotatoriamente no desaparecen éstas formaciones (bacterias aglutinadas).

2) Una reacción negativa, es aquella, en la cual, la mezcla suero-antígeno es homogénea, sin cambios, o sea que no hay aglutinación.

2) PRUEBA DE AGLUTINACION EN TUBO (LENTA).

Material y Reactivos :

a) Antígeno de Brucella abortus (Cepa 1119-3), elaborado en México por: ProNaBiVe, para la prueba en tubo, mantenido en refrigeración.

b) Solución Salina Fenolada; preparada en el Laboratorio de la F.E.S.-C.

c) Tubos de vidrio de 13 X 100 mm.

d) Gradilla con capacidad para 60 tubos.

e) Pipetas serológicas de Bang graduadas en: 0.08, - 0.04, 0.02, 0.01 y 0.005 ml.

f) Pipetas de 1 ml.

g) Caja oscura con fuente de luz propia.

Método:

Para efectuar esta prueba, primeramente se prepara la solución fenolada, con la siguiente fórmula: 1lt. de agua - destilada, 5 grms. de Fenol, y 85 grms. de Cloruro de sodio. En esta solución se diluye un frasco de antígeno (ProNaBi--Ve), para la prueba de tubo, y se debe dejar reposar un día antes de la prueba conservandose en refrigeración.

Para la prueba, se utilizan 4 tubos para cada muestra

de suero que corresponden a las diluciones de: 1/25, 1/50, 1/100 y 1/200. Se saca el antígeno y el suero a temperatura ambiente 2 hrs. antes de iniciar la prueba.

Se toma el suero con la pipeta de Bang, siguiendo el mismo método que en la prueba anterior, se debe de igualar a la marca de 0.08, se limpia la pipeta con papel absorbente, y se deposita en un tubo, la cantidad de 0.08 ml., posteriormente en los otros 3 tubos, las cantidades de 0.04, 0.02, y 0.01 ml. Se carga la pipeta de 10 ml., con el antígeno diluido en solución fenolada y se depositan 2 ml. en cada tubo, obteniéndose las diluciones de 1/25, 1/50, 1/100 y 1/200 respectivamente.

Los tubos se agitan durante 30 seg. cada uno, para homogenizar la mezcla de Suero/Antígeno, se colocan en la gradilla y se meten a incubar a temperatura de 37.5° en la estufa (Laboratorio de la F.E.S.-C), durante 24 a 48 hrs. que es el tiempo en que se debe efectuar la lectura, que se hizo en la caja obscura con fuente de luz propia, la capacidad de la gradilla nos permite efectuar 10 muestras en cada sesión.

Interpretación de la reacción:

1) Una reacción positiva es aquella que al realizar una leve agitación al tubo se presenta en la mezcla de suero antígeno, la formación de grumos pequeños y uniformes -- suspendidos en la mezcla, que no se disuelven a la agita --

ción.

2) Una reacción negativa, es aquella, en que la mezcla de Suero-Antígeno se observa, turbia, sin grumos en el tubo, y que al realizar una agitación, se pueden presentar grumos, pero, éstos son más grandes e irregulares y se disuelven. Estas partículas las consideramos como material contaminante de la mezcla, pero no como aglutinación.

3) PRUEBA DE LA TARJETA

Material y Reactivos :

- a) Antígeno Brucella abortus (cepa 1119-3), elaborado en México por: ProNaBiVe, para la prueba en tarjeta y mantenido en refrigeración.
- b) Placa de Cristal cuadrículada de 3cm. por lado.
- c) Goteros estandar, que depositan una gota que equivale a 0.03 ml.
- d) Palillos de madera.

Método:

Se saca el antígeno y el suero, que deben permanecer a temperatura ambiente 1 a 2 hrs. antes de iniciar la prueba.

Con el gotero estandar se toma el suero y se deposita una gota en el centro de un cuadro de la placa de cristal, posteriormente con otro gotero estandar se toma el antígeno y se deposita una gota en el suero de la placa, con el palillo de madera se homogeniza la mezcla de suero-antígeno.

Se mueve la placa de cristal rotatoriamente, durante 4 minutos, la lectura se efectúa inmediatamente moviendo la placa ligeramente hacia abajo y hacia arriba para observar la reacción.

La ventaja de utilizar la placa de cristal cuadrícula, es que se pueden efectuar 2 o más pruebas al mismo tiempo, teniendo el cuidado de enjuagar bien el gotero, para quitar los residuos de suero de cada muestra y utilizando un palillo diferente, para cada una de ellas.

Interpretación de la Reacción :

La lectura de cada muestra se hizo bajo el siguiente criterio:

1) Se considera una reacción positiva cuando en la mezcla suero-antígeno, al movimiento presenta la formación de grumos o pequeñas partículas muy finas que no desaparecen. Esta reacción es parecida a la que se observa en la prueba de placa.

2) Se considera una reacción negativa cuando la mezcla suero-antígeno se observa homogénea, y al movimiento no presenta ningún cambio.

CUADRO No 1

PATRON DE INTERPRETACION (F.A.O./ O.M.S.)

CANTIDAD DE SUERO POR GOTTA (ML) Ml.				INTERPRETACION EN GANA <u>DO</u> VACUNO.	
0.08	0.04	0.02	0.01	NO VACUNADO	VACUNADO
1/25	1/50	1/100	1/200		
-	-	-	-	NEGATIVO	NEGATIVO
I	-	-	-	NEGATIVO	NEGATIVO
+	-	-	-	NEGATIVO	NEGATIVO
+	I	-	-	SOSPECHOSO	NEGATIVO
+	+	-	-	SOSPECHOSO	NEGATIVO
+	+	I	-	SOSPECHOSO	SOSPECHOSO
+	+	+	-	POSITIVO	SOSPECHOSO
+	+	+	I	POSITIVO	SOSPECHOSO
+	+	+	+	POSITIVO	POSITIVO

I Aglutinación Incompleta.

R E S U L T A D O S

La interpretación de todos los resultados se hizo en base al patrón de la F.A.O. / O.M.S. (cuadro No. 1).

De las 500 muestras serológicas realizadas en éste -- trabajo, por medio de 3 pruebas diferentes para el diagnóstico de Brucelosis, se encontraron los siguientes resultados:

1) PRUEBA EN PLACA (RAPIDA)

Esta prueba demostró, que de las 500 muestras, 43 dieron títulos de 1/100 y superiores, lo que corresponde a un 8.6% de reactores considerados positivos, 33 presentaron títulos hasta de 1/50, dando un 6.6% de reactores considerados sospechosos, 40 presentaron títulos de 1/25, dando un 8% de reactores considerados negativos y 384 no presentaron ningún título dando un 76.8% considerados negativos.

Los resultados de ésta prueba se pueden observar en el cuadro No. 2 de éste trabajo.

2) PRUEBA EN TUBO (LENTA)

En ésta prueba se encontraron 32 muestras con títulos de 1/100 y superiores, que corresponden a un 6.4% de reactores positivos, 12 con títulos de 1/50, que corresponde a un 2.4% de reactores considerados sospechosos, 6 presentaron -

títulos de 1/25 correspondiente a un 1.2% de reactores negativos y 450 no presentaron ninguna reacción y corresponden a un 90% de reactores negativos.

Los resultados se pueden observar en el cuadro No. 3 de éste trabajo.

Cuadro No. 2

RESULTADOS DE LA PRUEBA EN PLACA.

INTERPRETACION	CANTIDAD Y TITULOS DE SUERO				No. DE MUESTRAS	%
	.08ml	.04 ml.	.02 ml.	.01 ml.		
	1/25	1/50	1/100	1/200		
NEGATIVO	-	-	-	-	384	76.8%
NEGATIVO	+	-	-	-	40	8 %
SOSPECHOSO	+	+	-	-	33	6.6%
POSITIVO	+	+	+	-	13	2.6%
POSITIVO	+	+	+	+	30	6 %

8.6% POSITIVOS

6.6% SOSPECHOSOS

84.8% NEGATIVOS

Cuadro No. 3

RESULTADOS DE LA PRUEBA EN TUBO.

INTERPRETACION	CANTIDAD Y TITULOS DE SUERO				No. DE MUESTRAS	%
	.08 ml.	.04 ml.	.02 ml.	.01 ml.		
	1/25	1/50	1/100	1/200		
NEGATIVO	-	-	-	-	450	90.0%
NEGATIVO	+	-	-	-	6	1.2%
SOSPECHOSO	+	+	-	-	12	2.4%
POSITIVO	+	+	+	-	10	2.0%
POSITIVO	+	+	+	+	22	4.4%

6.4% POSITIVOS

2.4% SOSPECHOSOS

91.2% NEGATIVOS

3) PRUEBA DE LA TARJETA

En ésta prueba 30 muestras presentaron reacción y corresponde a un 6%, por lo que se consideran reactores positivos.

El comportamiento de cada muestra en las pruebas realizadas se analiza y se compara en el cuadro No. 4 de este trabajo.

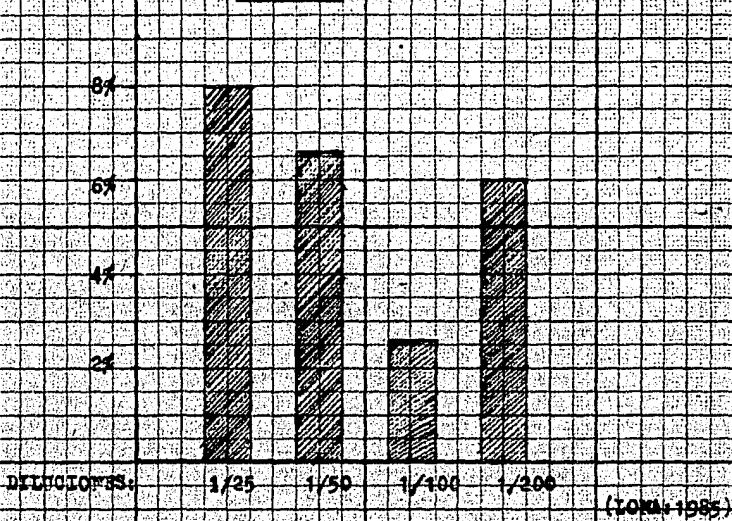
Cuadro No. 4

COMPORTAMIENTO DE CADA UNA DE LAS MUESTRAS ANTE LAS PRUEBAS REALIZADAS.

TIPO DE PRUEBA	No. DE MUESTRAS	TITULOS Y No. DE REACTORES				TOTAL	No. DE MUESTRAS POSITIVAS
		1/25 .08	1/50 .04	1/100 .02	1/200 .01		
AGLUTINACION RAPIDA EN PLACA.	500	40	33	13	30	116	43
AGLUTINACION LENTA EN TUBO.	500	6	12	10	22	50	32
PRUEBA DE TARJETA	500	0	0	9	21	30	30

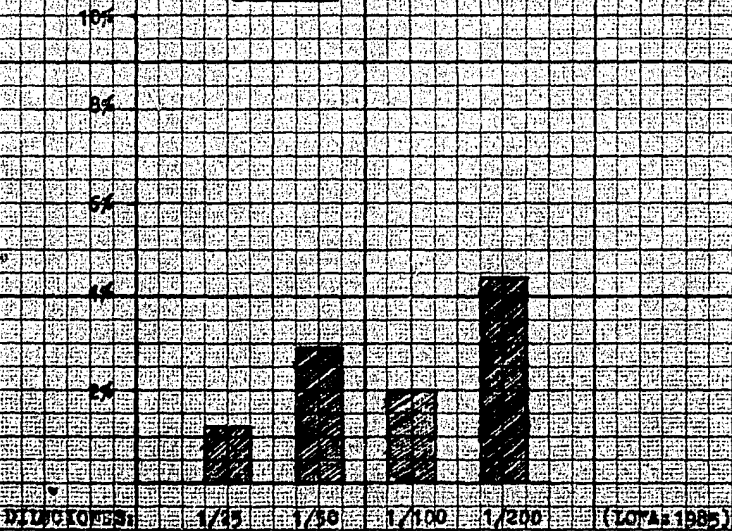
FORNETAJE DE REACTORES DE LA PRUBA

DE PLACA



FORNETAJE DE REACTORES DE LA PRUBA

BY TUBO



D I S C U S I O N

De las 500 pruebas efectuadas en los sueros sanguíneos de equinos, los resultados obtenidos en éste trabajo demostraron que en la prueba de aglutinación en placa el 8.6% de los sueros, resultaron positivos con títulos de 1/100 y superiores en comparación con la prueba en tubo que fué inferior y presentó un 6.4% de positivos.

En la prueba en placa reaccionaron un 6.6% de los sueros, comparado con un 2.4% de reacción de los sueros, en la prueba en tubo.

La presentación de títulos hasta de 1/25 considerados negativos, en la prueba de placa se encontró un 8% de sueros que dieron reacción, mientras que en la prueba en tubo únicamente se observó un 1.2%.

De los sueros que no presentaron ningún tipo de reacción y son negativos, de la prueba en placa fueron 76.8% en tanto que en la prueba en tubo fué superior y corresponden a 90%.

La prueba de la tarjeta presentó un 6% de sueros que presentaron reacción positiva y un 94% sin reacción que fueron negativos.

Haciendo una comparación en los resultados de las 3 pruebas, cabe mencionar, las siguientes observaciones: De -

las 43 muestras consideradas positivas dentro de los títulos de 1/100 a 1/200 de la prueba en placa 32 de estas muestras, presentaron títulos en la prueba en tubo, y de las 30 positivas en la prueba de la tarjeta 21 muestras se encuentran dentro de los títulos de 1/200 y 9 muestras en los títulos de 1/100.

En los títulos de 1/25 a 1/50 de los 73 que se observaron en la prueba de aglutinación en placa, solo 18 se observaron en estos títulos en la prueba en tubo.

La prueba de placa presenta un mayor porcentaje de reactores positivos y sospechosos, y una mayor número de casos en todos los títulos, en comparación con la prueba en tubo, esto se puede deber a que la de placa es una prueba rápida, con mayor concentración, 11% de antígeno produciendo un mayor número de reacciones inespecíficas con las inmunoglobulinas. En cambio la prueba en tubo es lenta y altamente sensible, más específica en comparación con la de placa, produciendo reacciones específicas a las inmunoglobulinas.

En el caso de la prueba de la tarjeta, ésta considerada como una prueba rápida y específica, que puede detectar anticuerpos de tipo IgG, recomendado por los expertos en Brucelosis, por su gran exactitud, técnica moderna y especificidad.

Los resultados obtenidos en las 3 pruebas son de gran importancia:

- El criterio a seguir en la interpretación de resultados es el que se usa en los bovinos. Algunos autores consideran como positividad en equinos, la presentación en cualquier título en las pruebas de aglutinación, lo que daría como consecuencia mayor porcentaje de positividad.

C O N C L U S I O N E S

- Se demostró la presencia de Inmunoglobulinas contra Brucelosis en los sueros de equino estudiados.
- De las 3 pruebas la que demostró mayor sensibilidad con un mayor número de reactores fué:
 - 1) Placa; Con un 8.6% de reactores positivos y 6.6% de reactores sospechosos.
 - 2) Tubo : 6.4% de reactores positivos y 2.4% de reactores sospechosos.
 - 3) Tarjeta: 6% de reactores positivos.
- Para efectuar un estudio serológico y de diagnóstico de Brucelosis en equinos, se puede utilizar la combinación de éstas 3 pruebas de aglutinación por su rapidez, especificidad y fácil técnica de realización.
- La Brucelosis en equinos ha sido menos estudiada en comparación con otras especies, y estos a veces conviven entre si, así que es necesario conocer la prevalencia y de tección del foco de infección de la enfermedad.

SUGERENCIAS

- La Brucelosis se encuentra presente en el rastro de Izta palapa, presentando un importante foco de diseminación - de ésta enfermedad en el país.
- Ya que en los equinos no se efectua la vacunación contra ésta enfermedad, no deberían de presentar anticuerpos. - Al presentarlos, se confirma la presencia de la Brucelosis en ésta especie. Sugiriendo incluir éstos estudios_ con los de otras especies, en la continua vigilancia del programa de Brucelosis para la erradicación y control de ésta enfermedad.
- Es evidente que la Brucelosis en los equinos ésta tomando una amplia distribución en nuestro país, representando un gran foco de infección y diseminación, principalmente para el hombre.
- Se sugiere realizar pruebas de Fijación de Complemento y Mercaptoetanol, para complementar y dar una información_ más amplia en los resultados.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Alton, G.G., Jones, L.M. and Pietz, D.E: Laboratory -- Techniques in Brucellosis.- 2a. Ed. 1975: WHO, Geneve.
- 2.- Blood, D.C., Henderson, J.A: Medicina Veterinaria.- 5a. Ed. 1976: Editorial Interamericana. Pags. 387 - 396.
- 3.- Comite Mixto F.A.O.-O.M.S. de Expertos en Brucelosis.-- 5o. Informe, Ginebra 1970; Editado por la F.AO. y la - O.N.U.
- 4.- Eisen, Herman N; Inmunología.- 1979: Ed. Salvat pags. - 408 - 412 y 426-437.
- 5.- Equine Brucellosis: Veterinary Record: 96(22) 493 - - 1975.
- 6.- Flores Castro, R: Características de las Brucellas.- Me- morias del foro Nacional sobre Brucelosis, Dic. 1978. - E.N.E.P.-C. I.N.I.P. Pags. 1-9.
- 7.- Godoy, A.M., and Barg, L: Aspectos etiológicos de Infec- cao Brucelica.- II Investigacao serológica em Cavalos - de Corrida.- Arquivos de Escola de Veterinaria de Uni-- versidade Federal de Minas Gerais 29(1) 35-42, 1977.
- 8.- Jawetz, E., Melnick, J., Adelberg, E: Manual de Micro- biología Médica.- 10a. Ed. 1980: Ed. El Manual Moderno. Pags. 252-254.

- 9.- Jubb, K.V., Kennedy, Peter C: Patología de los animales Domésticos.- Tomo 1, 1979; Ediciones U.P.O.M.E. - Pags. 618 - 624.
- 10.- Moreno, E., Speth, S.L., Jones, L.M.: Berman, D.T: Inmunochemical Characterización of Brucella Lipopolysaccharides and polysaccharides.- Infección and Immunity, 1981, 31 (1) Pag. 214-222.
- 11.- Navarrete, S.M.G: Evaluación Serológica de Brucelosis en cerdos del Corregimiento de Cacotal Departamento de Cordoba.- Revista Instituto Colombiano Agropecuario, - 1979 (14) (1) pags. 25-31.
- 12.- Niccoletti, Paul: Diagnóstico de Brucelosis, Algunos problemas y Nuevos Descubrimientos.- Memorias del Foro Nacional Sobre Brucelosis: Dic. 1981, E.N.E.P.C. I.N. I.P. Pags. 67-75.
- 13.- Olitzki A: Immunological Methods in Brucellosis Research.- Part I: In vitro procedures.- 1976. Ed. S. -- Karger, Jerusalem Pags. 1-2 y 120-123.
- 14.- O'Sullivan B.M: Brucella abortus Titres and Bursitis in the Horse (correspondance).- Australian Veterinary Journal: 1981 Pags. 103-104.
- 15.- Pijoan, C., Montaraz, J.A: Immunidad Contra Brucella.- Memorias del Foro Nacional Sobre Brucelosis: Dic. 1978, ENEPC - INIP pags. 60-66.

- 16.- Pijoan, C., Flores, R: Curso sobre enfermedades en el Tracto reproductor de los Bovinos.- F.E.S.C. - U.N.A.M. Mayo 1982.
- 17.- Poester, F.P., Ramos, E.T., Benfica, A.C: Difficulties in the interpretation of serological test (Card and -- Mercuric iodine test) in cattle vaccinated against Brucellosis.- Boletín de Instituto de Pesquisas Veterinarias, Desiderio Finamor, 1978 pags. 53-58.
- 18.- Robbins, Stanley L: Patología Estructural y Funcional.- 3a. Ed. 1984: Ed. Interamericana. Pag. 394.
- 19.- Rodríguez Heres: Epizootiología de la Brucelosis.- Memorias del Foro Nacional Sobre Brucelosis; Dic. 1978, E. N.E.P.C. - I.N.I.P. pags. 10-40.
- 20.- Rojo Lopez, José: Estudio Serológico Sobre Brucelosis en Equinos de México.- U.N.A.M. (Tesis) México 1973.
- 21.- Rannels.: Patología Veterinaria.- 2a. Ed. 1976: C.E.C. S.A.
- 22.- Sinha, B.P., Verma, B.B: Estudio sobre la prevalencia de Brucelosis equina en Punjab.- Boletín Oficial Internacional Epizootiología, 1979, 91 (7-8) Pags. 545-552.
- 23.- Sinha, B.P., Verma, B.B: Detección en suero de anticuerpos precipitantes de Brucella en equinos.- Boletín Oficial Internacional Epizootiología, 1979, 91(7-8) -- Pags. 553-558.

- 24.- Standard Dised Rose Bengal Test Bovine Brucellosis. - -
Australian Veterinary Journal: 1980, 56 (11) 555 (En)_
abs. 3871.
- 25.- Stration, E.C: Todo sobre los caballos.- ed. 1977: Im
Preso en Bilbao España, Ed. Fher pags. 91 - 92.
- 26.- Whitford, H. W: Aislamiento de Biotipo 4 de Brucella -
abortus de un Caballo.- Southwestern Veterinarian, - -
1980 Pags. 115-116.