



113
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ESTANDARIZACIÓN DE UN ANTÍGENO DE *Brucella canis*
M(-) PARA EL DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS CANINA
POR MEDIO DE LA PRUEBA DE AGLUTINACIÓN EN
PLACA.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

MARÍA CRISTINA RODRÍGUEZ SÁNCHEZ



ASESORES: Ph D. FRANCISCO SUÁREZ GÜEMES
Ph D. LELAND E. CARMICHAEL

MÉXICO, DISTRITO FEDERAL

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

**ESTANDARIZACION DE UN ANTÍGENO DE *Brucella canis*
M(-) PARA EL DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS CANINA
POR MEDIO DE LA PRUEBA DE AGLUTINACIÓN EN
PLACA**

Tesis presentada ante la
División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

de la

Universidad Nacional Autónoma de México
Para la obtención del título de
Médico Veterinario Zootecnista

Por

María Cristina Rodríguez Sánchez

Asesores: Ph.D. Francisco Suárez G.
Ph.D. Leland E. Carmichael

México, D.F.
1996.

DEDICATORIA

Este trabajo esta dedicado a:

Alfonso y Juana
mis padres.

Angel Alfonso
Maria Isabel
Maria del Refugio
Victor Manuel Fausto
mis hermanos.

Mauricio
Maria Fernanda
Juan Carlos
mis hijos

Al MVZ Juan M. Palacios A. por ayudar a conocerme mejor.

AGRADECIMIENTOS

Al Ph.D. Francisco Suárez G., por hacerme blanco de su tenacidad y entusiasmo.

Al Ph.D. Leland E. Carmichael por distinguirme con su afecto.

Al Ph.D. Roberto A. Cervantes Olivares por su confianza, amistad y apoyo incondicionales.

y como el corazón es ineditable siempre estarán ahí: José López, Yuma, Alfonso Valdivieso, Manuel Chirino, Pepe Rios, Raúl Vázquez, Martha Merino, Sara Aguilar, Gustavo García, Alex de la Peña, Elisa Nuño, Lety Romo, Jorge Pérez, Honorio Jiménez y Toño Aranda.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
MATERIAL Y MÉTODOS	9
RESULTADOS	11
DISCUSIÓN	13
CONCLUSIONES	18
LITERATURA CITADA	19

RESUMEN

RODRIGUEZ SÁNCHEZ, MARÍA CRISTINA. Estandarización de un antígeno de *Brucella canis* M(-) para el diagnóstico de brucelosis canina por medio de la prueba de aglutinación en placa (bajo la dirección de Francisco Suárez G. y Leland E. Carmichael).

La brucelosis canina es una enfermedad que usualmente termina la vida reproductiva del macho y es una importante causa de aborto en las hembras. El diagnóstico definitivo de la enfermedad se realiza mediante el aislamiento del microorganismo en el laboratorio, sin embargo, se han desarrollado pruebas útiles para identificar animales infectados. Estas son consideradas como tamiz, se realizan con diferentes antígenos, ya sea celulares, de extractos de pared celular o citoplasma. De entre ellos el antígeno celular elaborado con una variante M(-) de la cepa de *Brucella canis* RM6/66 ha demostrado ser particularmente sensible y específico, ya que reduce el índice de falsos positivos y a través de la Prueba de Aglutinación Rápida en Placa con 2 Mercapto-etanol (PARP con 2ME) se puede realizar un adecuado diagnóstico presuntivo de la infección y así determinar a los animales que deberán ser rastreados por métodos bacteriológicos para hacer un diagnóstico definitivo. El propósito de este trabajo fue estandarizar las condiciones de producción del antígeno celular elaborado con la variante M(-) de la cepa *Brucella canis* RM6/66, con el fin de usarlo con la PARP con 2ME para considerarlo como prueba tamiz de referencia en México. El antígeno producido en el laboratorio de Microbiología e Inmunología de la FMVZ UNAM con la cepa M(-) de *Brucella canis* mostró un comportamiento similar al obtenido con el antígeno producido en 1987 por Carmichael y Joubert al ser probado con sueros controles negativos, positivos y falsos positivos.

INTRODUCCIÓN

La brucelosis canina es una enfermedad con características clínicas y patológicas diversas de entre las cuales destacan la infertilidad, epididimitis y atrofia testicular en machos y el aborto en hembras o el nacimiento de cachorros débiles (9).

En la década de los años 60 en los Estados Unidos de Norteamérica, se observó un aumento en el número de abortos principalmente en perreras comerciales tecnificadas (3), el origen de estos abortos se asoció a un bacilo Gram negativo, el cual fue caracterizado en sus propiedades bioquímicas y clasificado dentro del género *Brucella* denominándose la especie *canis* para dicho agente etiológico(4), por ser diferente a las especies denominadas clásicas (*abortus*, *melitensis* y *suis*). Las propiedades bioquímicas de *B. canis* son similares a las de *B. suis*, pero al igual que *B. ovis* nunca ha sido observada en su fase lisa (L) y fue designada rugosa (R), ya que carece de las cadenas laterales O en el Lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa (5).

La enfermedad ha sido diagnosticada en diversas partes del mundo, siendo los informes más frecuentes en Estados Unidos, Japón Alemania, Brasil, Checoslovaquia, Madagascar, Argentina y México (9). Se considera que los índices más altos de seroprevalencia parecen ocurrir en México, Centro y Sudamérica (10).

Para el diagnóstico de la brucelosis canina se han utilizado pruebas serológicas de la misma forma que para diagnosticar brucelosis en otras especies animales.

Tres pruebas utilizadas comúnmente en el serodiagnóstico de la enfermedad son:

- 1) Prueba de Aglutinación Rápida en Placa (PARP) (6).
- 2) Prueba de Aglutinación en Tubo (PAT).
- 3) Prueba de Aglutinación en Tubo con 2 Mercapto-etanol (PAT con 2ME) (7).

Aún cuando muchas de las investigaciones han sido orientadas al desarrollo de antígenos que al ser utilizados en las pruebas mencionadas muestren una mayor sensibilidad y especificidad, no existe hasta el momento un procedimiento ni un antígeno estándar, por lo que la metodología y los resultados pueden variar entre laboratorios (13).

Existen algunos factores que dificultan el hecho de que un solo método serológico sea suficiente para realizar dicho diagnóstico, de entre estos factores destaca la naturaleza rugosa de los antígenos de superficie de *Brucella canis*, lo cual impide la purificación de un antígeno altamente específico.

Se debe considerar que durante el curso de la enfermedad, el microorganismo puede permanecer alojado en epidídimo o próstata sin provocar una respuesta serológicamente detectable, asimismo se han demostrado reacciones cruzadas con antígenos de otras bacterias (3).

Las investigaciones realizadas con las diferentes pruebas serodiagnósticas desarrolladas han servido de apoyo para detectar a

los animales que podrían estar actuando como reservorios y por tanto de ser sujetos análisis bacteriológicos, ya que hasta el momento el aislamiento del microorganismo es considerado como el único método para el diagnóstico definitivo de la infección (3).

De los procedimientos serológicos mencionados, en México se utiliza la PARP con antígeno de *Brucella canis* con fines diagnósticos sólo en algunos laboratorios tales como Microbiología de la FMVZ UNAM, el CENID-Microbiología y algún laboratorio de la industria privada, por lo que su difusión es limitada, mientras que en los Estados Unidos de Norteamérica se puede conseguir comercialmente la PARP que utiliza antígeno de *B. ovis*^{*}, siendo más amplio su uso.

La información epidemiológica sobre la enfermedad es reducida en México, Flores-Castro y Segura en el año de 1975 encontraron una seroprevalencia del 28% en 500 muestras de perros callejeros en el Distrito Federal (10).

La importancia de la serología en perros con problemas reproductivos se manifiesta en el trabajo de Briseño y colaboradores en el año de 1990, en donde también se sugiere que la prueba debe realizarse preferentemente con antígenos elaborados con *Brucella canis* (2).

Cabe señalar la importancia de la enfermedad desde el punto de vista de salud pública, aún cuando los informes de infección en el hombre son escasos. El médico veterinario debe estar alerta de la posibilidad de contagio que existe en el manejo de animales clínicos o serológicamente sospechosos de estar infectados.

* Pitman Moore, Inc., Washington Crossing, N.J. 80560

La necesidad de información y solicitudes de diagnóstico de la enfermedad son cada día más abundantes, sobre todo por criadores de razas puras, por lo que se consideró importante el contar con una prueba confiable y al mismo tiempo accesible que ayude tanto a obtener mayor información sobre la enfermedad desde el punto de vista epidemiológico como al control y erradicación de la misma.

Con la finalidad de ser utilizados en las pruebas mencionadas se han desarrollado antígenos homotípicos y heterotípicos. Los antígenos homotípicos se preparan con cepas de *B. canis* RM6/66 (10), una variante M(-) de esta cepa (12) y la cepa K76-620 (15). Los antígenos heterotípicos se preparan con *B. ovis* (11).

Durante algún tiempo el diagnóstico de la brucelosis canina se llevó a cabo mediante la PAT utilizando un antígeno celular producido con *B. canis* RM6/66, mediante esta prueba se detectan altos niveles de anticuerpos relacionados con los periodos de bacteremia, lo cual permite realizar el aislamiento bacteriológico durante esta etapa y obtener el diagnóstico definitivo, sin embargo el método ofrece desventajas para su uso en el campo, ya que requiere de diluciones seriadas de los sueros a probar y un periodo de incubación, además la producción masiva de la cepa mencionada es difícil debido a la tendencia del microorganismo a acordonarse después de una incubación prolongada (12) por lo que se desarrolló un antígeno heterotípico con *B. ovis* utilizando las ventajas que ofrece la similitud antigénica entre ambas especies (13). Este antígeno es utilizado para PARP y PAT.

El uso de *B. ovis* en la elaboración de un antígeno celular disminuye las dificultades de cultivo del microorganismo y teñido

con rosa de bengala proporciona un método alternativo con una mayor aplicación clínica. Este método tiene una sensibilidad que va del 90 al 95% , ya que un resultado negativo en la prueba se puede correlacionar en un alto grado con la ausencia de la infección, también hay que considerar que es el único antígeno en presentación comercial que puede conseguirse en los EE.UU. para efectuar pruebas de campo (12).

Tanto *B. canis* como *B. ovis* han sido utilizados para la producción de antígenos de extractos solubles de membrana externa (LPS) y proteicos, los cuales son utilizados para pruebas como la de Inmunodifusión en Gel de Agarosa (PIGA) (13). También se desarrolló una prueba de Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) (14).

La obtención de los extractos de pared celular se realiza a partir de cepas tanto de *B. canis* como de *B. ovis* mediante los procedimientos de adición de solución de deoxicolato de sodio o solución salina caliente, en ambos casos la actividad antigénica del extracto reside en la fracción LPS (13). Los extractos proteicos de citoplasma se obtienen mediante concentración de células por ultracentrifugación, fraccionamiento de las mismas y aplicación de solventes, lo cual da como resultado un extracto proteico soluble que es utilizado para pruebas de Inmunodifusión en Gel de Agarosa. La actividad antigénica en este caso esta dada por polipéptidos, los cuales no son específicos para *B. canis* ya que están presentes en otras especies del género *Brucella*, además se presenta siempre algún grado de contaminación con otras fracciones antigénicas como LPS (7).

* L.E. Carmichael. Comunicación personal.

La prueba de Inmunoensayo enzimático (ELISA) se realiza con un antígeno de pared celular purificado por afinidad mediante columnas inmunoabsorbentes. Esta prueba es considerada específica, detecta bajas cantidades de anticuerpos en estados crónicos de la enfermedad, pero no elimina las reacciones falsas positivas (14).

El uso de antígenos purificados reduce o elimina algunas de las reacciones inespecíficas observadas en las pruebas serológicas incrementando así la especificidad, pero esto no siempre resulta en un incremento de la sensibilidad.

Los estudios realizados con el antígeno celular elaborado con la cepa de *B. canis* RM6/66 M(-) han demostrado que utilizado en la PARP con 2ME reduce el índice de falsos positivos de 50% a 10% (5), esto representa una ventaja sobre los otros métodos y antígenos mencionados. La producción de este antígeno es técnicamente simple, ya que los cultivos tienen una menor tendencia a acordonarse o a autoaglutinar aún después de una incubación prolongada.

La cepa *B. canis* RM6/66 M(-), es una variante seleccionada de un aislamiento de campo M(+) cultivado en agar glicerol glucosa y ha sido estudiada en sus propiedades biológicas, encontrándose que presenta patogenicidad reducida (8), también se compararon sus antígenos de pared celular con los de la cepa tipo RM6/66 M(+), estudios donde se encontró que había diferencias en el número y tipo de antígenos presentes, así como en el tamaño y carga eléctrica de los mismos (16).

El objetivo del presente trabajo consistió en: a) realizar la producción de un lote de antígeno celular *B. canis* RM6/66 M(-) bajo las condiciones de trabajo en las instalaciones del Departamento de

Microbiología e Inmunología de la FMVZ UNAM, b) suspender el antígeno en solución amortiguadora de Tris-Maleato 0.4M a diferentes pH (7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 8.6 y 9.0) y observar su comportamiento al probarlo con sueros controles negativos y positivos y c) probar el antígeno suspendido en solución amortiguadora de Tris-Maleato 0.4 M a un pH de 8.6 con sueros controles negativos y falsos positivos.

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo fue realizado en las instalaciones del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Cepa bacteriana. Se utilizó la cepa de referencia de *Brucella canis* RM6/66 M(-), la cual fue donada por el Dr. Leland E. Carmichael del James A. Baker Institute for Animal Health USA.

Elaboración del antígeno. Se elaboró un lote de antígeno conforma a la técnica descrita por Carmichael y Joubert en el año de 1987. El procedimiento consiste en cultivar al microorganismo en botellas de Roux con medio de agar *Brucella* al 2%, incubar durante 48 hrs. en condiciones de aerobiosis y colectar la biomasa en solución salina fisiológica. Las células se inactivan por calor en baño María a 60 C durante una hora, ajustándose después el paquete celular a un volumen de 6%. Las células se tiñen con rosa de bengala al 1% durante toda la noche en agitación magnética a 4 C, se lavan tres veces por medio de centrifugado y se realiza la suspensión final en solución amortiguadora de Tris-Maleato 0.4 M a un pH de 7.0 ajustándose nuevamente el paquete celular a un volumen de 6%.

Con el fin de determinar si el pH de la suspensión final del antígeno afecta los resultados de la PARP con 2ME se realizaron 6 alicuotas de 10 ml del antígeno elaborado, las cuales fueron suspendidas en solución amortiguadora de Tris-Maleato 0.4 M ajustando el pH a las siguientes concentraciones: 7.0, 7.5, 8.0,

8.5, 8.6 y 9.0, siendo 7.0 el pH descrito en el procedimiento original (6). Cada una de las alícuotas fue probada con la PARP (6) con 2ME por medio de diluciones dobles de 1:25 hasta 1:400 con 6 sueros controles positivos¹ y 5 negativos², los cuales fueron obtenidos del banco de sueros del J.A. Baker Institute for Animal Health.

El antígeno suspendido en la solución amortiguadora a un pH de 8.6 fue probado además con 16 sueros control falsos positivos³ que fueron obtenidos del banco de sueros del J.A. Baker Institute for Animal Health.

Interpretación de resultados. Las pruebas realizadas fueron interpretadas mediante observación en microscopio invertido anotándose el grado de aglutinación conforme al procedimiento convencional +1, +2, +3 y +4 (1).

¹ Suero de animales SPF infectados experimentalmente.

² Suero de animales SPF.

³ Sueros de animales de campo.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la prueba de Aglutinación Rápida en Placa con 2Mercapto-etanol utilizando el antígeno de *Brucella canis* RM6/66 M(-) fueron los siguientes :

Sueros controles negativos. Las pruebas realizadas con los 5 sueros fueron negativas en todos los casos.

Sueros controles positivos. Los resultados obtenidos en las pruebas realizadas a 6 sueros controles positivos utilizando las alícuotas del antígeno suspendidas en solución amortiguadora de Tris-Maleato 0.4 M a diferentes pH señalan que el antígeno es capaz de mostrar una adecuada aglutinación en todas las diluciones probadas, por lo que en todos los casos el resultado de la prueba es positivo. En este caso se consideró que la presentación mas deseable del antígeno es aquella que no presenta grumos en la suspensión, lo cual fue adecuado en el pH de 8.6.

Los resultados obtenidos en las pruebas realizadas con 16 sueros falsos positivos utilizando el antígeno suspendido en solución amortiguadora de Tris- Maleato 0.4 M a un pH de 8.6, se presentan en el cuadro 1, el cual nos muestra de manera general que el título de aglutinación se considera menor cuando la prueba se realiza haciendo un breve tratamiento al suero con 2Mercapto-etanol antes de adicionar el antígeno.

CUADRO 1.

SUEROS CONTROL FALSO POSITIVOS.
AGLUTINACIÓN CON EL ANTÍGENO *B. canis* RM6-66 M(-) E
SUSPENSIÓN DE SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE TRIS-MALEATO 0.4 M
A UN pH DE 8.6 CON Y SIN 2-ME

Suero No.	Título con 2-ME	Título sin 2-ME
5972	negativo	1:25
6187	1:50	1:50
6068	1:25	1:200
5827	1:25	1:100
5990	1:25	1:50
5726	1:25	1:100
6170	1:25	1:400
FP89	1:25	1:100
6171	negativo	1:200
6157	negativo	negativo
5723	1:25	1:400
5956	negativo	1:25
5999	1:50	1:200
5824	negativo	1:25
6033	1:100	1:400
6049	1:400	1:400

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en las pruebas realizadas con el antígeno elaborado en México nos indican que se comporta de manera similar al producido por Carmichael y Joubert en USA (6). El antígeno no aglutinó con ninguno de los sueros controles negativos, esto es mantiene la utilidad de la prueba para detectar animales no infectados, de la misma manera que lo hace la PARP con 2ME con antígeno de *Bruceella ovis*, por lo que ambos antígenos podrían ser utilizados para pruebas de rastreo en criaderos donde previamente se ha diagnosticado la infección por métodos bacteriológicos (7). En el caso de las pruebas realizadas con los sueros controles positivos se observó aglutinación en todas las diluciones probadas, desde 1:25 hasta 1:400, lo cual es similar a los resultados obtenidos por Carmichael y Joubert en el estudio comparativo entre el antígeno de *B. ovis* y el de *B. canis* M(-) en 1997, por lo que se considera que el antígeno es útil para la detección de animales positivos.

Cinco de los sueros falsos positivos probados, se revelaron como negativos, lo cual podría deberse a la eliminación de aglutininas no específicas por efecto del 2Mercapto-etanol, pero también podría deberse a una mayor especificidad del antígeno, lo que tendrá que ser demostrado a través de un estudio serológico posterior.

Los diferentes pH de la solución amortiguadora de Tris-Maleato 0.4 M fueron probados para determinar si existe algún

efecto que pueda interferir con la interpretación de la prueba. En la elaboración de lotes de este antígeno en Estados Unidos por parte de Carmichael y colaboradores se ha determinado que un pH bajo en la solución amortiguadora de la suspensión final puede ser causa de autoaglutinación del antígeno. También se determinó que esta autoaglutinación es más marcada en pH por debajo de 6.2 y que no ocurre hasta que se adiciona suero al realizar la prueba.

En el caso del antígeno elaborado con *B. ovis* también se observó que cuando el pH de la solución amortiguadora de la suspensión final era por arriba de 7.4 había formación de grumos (11).

Al desarrollarse el antígeno con la cepa M(-) se mantuvo el pH de la solución amortiguadora para la suspensión final entre 7.0 y 7.4, de la misma manera que se describe el método de elaboración del antígeno de *B. ovis*, sin embargo las características biológicas y antigénicas de la cepa M(-) son diferentes, por ejemplo, al compararla con la cepa M(+) se encontró que la cepa M(-) es menos hidrófoba, lo cual podría explicar que al usar cepa con un pH inferior a 8.6 se pueda observar ocasionalmente la formación de grumos, se debe señalar que la presencia de estos grumos no es constante y que se presenta espontáneamente, este efecto se elimina cuando el pH es de 8.6 a 8.9.

También se debe tomar en cuenta que la cepa de *B. canis* M(-) se considera de patogenicidad reducida, lo cual es deseable en una cepa que se usará para una propagación masiva en condiciones de laboratorio, debido a que representa un riesgo menor en su manipulación por parte del personal.

Existe un antígeno elaborado en México con la cepa M(+) el cual se suspende en una solución amortiguadora de carbonatos con un pH de 8.9, (14), sin embargo el pH de las soluciones de carbonatos no es estable debido a que absorben CO₂ atmosférico¹, por lo que es poco probable que el pH se mantenga en un antígeno de trabajo que se guarda en refrigeración por periodos de tiempo indefinidos.

Las investigaciones realizadas desde el reconocimiento de la enfermedad en el año de 1966 (2) han sido orientadas por una parte a determinar todas las características clínicas, patológicas y epidemiológicas de la enfermedad, por otro lado al estudio profundo del agente etiológico, pero también se aprecian importantes esfuerzos para desarrollar un método serológico que pueda considerarse como prueba de referencia, debido a que el diagnóstico definitivo de la enfermedad por el método bacteriológico siempre ofrecerá limitaciones para su realización en cuanto a disponibilidad, recursos y costo de los análisis.

En el caso de la brucelosis canina como en el de muchas otras enfermedades infecciosas de los animales, las pruebas serológicas constituyen un elemento de apoyo importante para el diagnóstico. Algunas de estas pruebas ofrecen ventajas sobre otras debido a factores técnicos para la elaboración de los antígenos requeridos, pero también de manera relevante a que puedan llevarse a cabo a nivel de campo a través de métodos sencillos de realizar e interpretar.

Todas las pruebas desarrolladas para el diagnóstico serológico de la brucelosis canina tienen en mayor o menor grado un margen de

¹L.E. Carmichael. Comunicación personal.

error, en ellas el mayor problema son las reacciones falsas positivas (6), se ha determinado que las reacciones cruzadas se deben a la relación antigénica entre *Brucella canis* con otras bacterias, algunas de ellas pertenecientes al mismo género como en el caso de *B. ovis*, *B. abortus* 45/20, *B. abortus* cepa lisa y otras no relacionadas como cepas mucoides de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus spp*, cepas de *Bordetella bronchiseptica*, *Actinobacillus equuli*, *Acinetobacter calcoaceticus* y *Pseudomonas 'IHK-type 1'* (6).

La elección del antígeno celular *B. canis* RM6/66 M(-) se basa en el hecho de que este antígeno utilizado mediante la PARP ha demostrado que reduce el índice de resultados falsos positivos al ser comparado con el antígeno que utiliza *B. ovis*, sin embargo a la fecha no se ha comparado objetivamente con otros métodos.

Los intentos para purificar un antígeno específico para *B. canis* no han sido del todo satisfactorios ya que con los métodos utilizados se obtienen siempre determinantes antigénicos que no son exclusivos del microorganismo, por lo que no reducen las reacciones falsas positivas.

El procedimiento de producción del antígeno con la cepa M(-) es mucho más simple que el de los extractos de pared celular o proteicos, por lo que la estandarización en su producción es más accesible aún para aquellos laboratorios con recursos limitados.

El diagnóstico de la brucelosis canina es una solicitud cada vez más frecuente en los laboratorios de diagnóstico veterinarios en México, por lo que existe la necesidad de contar con un método

sencillo para detectar animales infectados con *B. canis*, señalando a los que deban ser analizados por métodos bacteriológicos.

La enfermedad es importante tanto para los animales como para el humano, hay que resaltar el riesgo potencial que existe para el médico veterinario en el manejo de animales infectados debido al poco control de la enfermedad en las poblaciones caninas de México.

CONCLUSIONES

La cepa RM6/66 es adecuada para la preparación del antígeno celular bajo las condiciones de trabajo en México.

No hay diferencias cualitativas en los resultados obtenidos con los antígenos suspendidos en diferentes pH y que fueron probados con sueros control positivos. Sin embargo en el pH originalmente recomendado de 7.0 a 7.4 se llega a observar ocasionalmente la formación de grumos, lo cual puede interferir en la observación microscópica durante la interpretación de la prueba, es por ello que se considera más adecuado realizar la suspensión final del antígeno en la solución amortiguadora con pH de 8.6 donde ya no se observa el problema.

El antígeno elaborado en México con la cepa *B. canis* RM6/66 M(-) demostró una adecuada aglutinación macroscópica al ser probado con los sueros control positivos. Esto es una característica deseable en este tipo de pruebas.

La prueba de aglutinación Rápida en Placa (PARP) con el antígeno de *B. canis* RM6/66 M(-) elaborado en México debe realizarse adicionando al suero 2Mercapto-etanol.

Es necesario realizar en México un estudio que determine la sensibilidad y especificidad de este antígeno, mediante un muestreo serológico y un rastreo bacteriológico de los animales.

BIBLIOGRAFÍA

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

1. Alton, G.G.; Jones, L.M. and Pietz, D.E.: Laboratory Techniques in Brucellosis. 2nd. De. World Health Organization, Geneva (1975).
2. Briseño, G.H.; Suárez G.F.; Flores-Castro, R. y Páramo, R.M.: Problemas Reproductivos Asociados a *Brucella canis* en Perros Machos. Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. (1990).
3. Carmichael, L.E.: Brucellosis caused by *Brucella canis*. CRC Handbook Series on Zoonoses. Vol I Chapter 14: 350-385 Editor J.H. Steele. CRC Press, Inc. Boca Raton. Miami, USA (1987).
4. Carmichael, L.E. and Bruner, D.W.: Characteristics of a Newly-Recognize Species of *Brucella* Responsible for Infectious Canine Abortions. Cornell Vet. Vol. 58: 579-592 USA (1968).
5. Carmichael, L.E. and George, L.W. Canine Brucellosis: Newer Knowledge. Develop. biol. Standard. Vol. 31: 237-250 (1976).
6. Carmichael, L.E. and Joubert, J.C.: A Rapid Slide Agglutination Test for the Serodiagnosis of *Brucella canis* infection that Employs a Variant (M-) Organism as Antigen. Cornell Vet. 77: 3-12 USA (1987).
7. Carmichael, L.E.; Zoha, S.J. and Flores-Castro, R.: Problems in the Serodiagnosis of Canine Brucellosis: Dog Responses to Cell Wall and Internal Antigens of *Brucella canis*. Develop. biol. Standard. Vol. 46: 371-386 (1984)

8. Carmichael, L.E.; Zoha, S.J. and Flores-Castro, R.: Biological Properties and Dog Response to a Variant (M-) Strain of *Brucella canis*. *Develop. Biol. Standard.* Vol. 56: 649-656 S. Karger, Basel, (1984).
9. Flores Castro, R. y Carmichael, L.E.: Brucelosis causada por *Brucella canis*. *Ciencia Veterinaria* Vol. 3: 178-197 México, (1981).
10. Flores-Castro, R. and Segura, R.: A Serological and Bacteriological Survey of Canine Brucellosis in Mexico. *Cornell Vet.* Vol. 66:3, 347-351 USA, (1976).
11. Lisle, W.G. and Carmichael, L.E.: A Plate Agglutination Test for the Rapid Diagnosis of Canine Brucellosis. *Am. J. Vet. Res.* Vol. 35:7, 905-909 USA, (1974).
12. Lisle, W.G. and Carmichael, L.E.: Development of a Rose Bengal Stained Plate-Test for the Rapid Diagnosis of *Brucella canis* Infection. *Cornell Vet.* Vol. 68: 530-543 USA, (1978).
13. Pollock, V.H.: Canine Brucellosis. Current Status. *Compendium on Continuing Education*, 255-267 USA, (1978).
14. Serikawa, T.; Iwaki, S.; Mori, M.; Muraguchi, T. and Yamada J.: Purification of a *Brucella canis* Cell Wall Antigen by Using Immunosorbent Columns and Use the Antigen in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Specific Diagnosis of Canine Brucellosis. *Clin. Microbiol. ASM*, Vol. 27:5 837-842 Japan, (1989).
15. Vázquez, N.J.; Velázquez, Q.F. y Mancera, M.A.: Utilización de un Antígeno de *Brucella canis* Teñido con Rosa de Bengala para

Diagnosticar la Brucelosis Canina. *Memorias del XXII Congreso Nacional de Microbiología*. Acapulco Guerrero, México (1991).

16. Zoha, S.J. and Carmichael, L.E.: Properties of Cell Wall Antigens of Virulent *Brucella canis* and a Less Mucoïd Variant of Reduced Pathogenicity. *Am. J. Vet. Res.* Vol. 43:1, 171-174 USA, (1982).