



124
Zej

DETECCION DE ANTICUERPOS CONTRA Brucella spp
EN CERDOS DE ABASTO CON LAS PRUEBAS DE
TARJETA, FIJACION DE COMPLEMENTO Y ELISA
COMPETITIVA

T E S I S

PRESENTADA ANTE LA

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES DE LA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DE LA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

PARA LA OBTENCION DEL TITULO DE

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

POR

KENIA

SALDAÑA

GONZALEZ

ASESORES :

M.V.Z. EDGAR ALFONSECA SILVA

M.V.Z. EFREN DIAZ APARICIO

M.V.Z. FRANCISCO SUAREZ GÜEMES

MEXICO, D. F.

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.

A MIS PADRES:

Porque no existirá una forma de agradecer una vida de sacrificios y esfuerzos quiero que sientan que el objetivo logrado también es suyo, y que la fuerza que me ayudó a conseguirlo fue su apoyo.

GRACIAS

A MI HERMANA GEMA :

Por haberme impulsado a continuar luchando cuando más lo necesite

A MARCO ANTONIO

**Por su apoyo comprensión y paciencia.
GRACIAS**

A MVZ EDGAR ALFONSECA SILVA:

En agradecimiento y a su magnífica colaboración y dirección de este trabajo.

A LA FAMILIA RAMIRO MONTES:

**Por su incondicional colaboración y su estupendo apoyo para la realización de
este trabajo.**

**Mis agradecimientos a mis asesores MVZ EDGAR ALFONSECA SILVA, MVZ
EFREN DIAZ APARICIO Y MVZ FRANCISCO SUAREZ GÜEMES**

**Al Honorable Jurado
Con profundo agradecimiento.**

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

INDICE

RESUMEN	2
INTRODUCCION	3
HIPOTESIS	13
OBJETIVOS	14
MATERIAL Y METODOS	15
RESULTADOS	17
DISCUSION	21
CONCLUSIONES	25
LITERATURA CONSULTADA	27

RESUMEN

SALDAÑA GONZALEZ KENIA. Detección de Anticuerpos contra *Brucella spp* en cerdos de abasto con las pruebas de Tarjeta, Fijación de Complemento y ELISA competitiva (bajo la asesoría: MVZ. EDGAR ALFONSECA SILVA, MVZ EFREN DIAZ APARICIO, MVZ FRANCISCO SUAREZ GÜEMES.

La brucelosis es una de las principales zoonosis bacteriana en México por lo que se encuentra sujeta a campaña de control oficial. En nuestro país se han realizado pocos trabajos encaminados a determinar la frecuencia de la brucelosis en cerdos. No existen pruebas serológicas cien por ciento confiables para esta especie, la mayoría de éstas han sido desarrolladas para bovinos y caprinos, por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de anticuerpos contra *Brucella spp* en cerdos para abasto, utilizando las siguientes pruebas Fijación de Complemento (FC), Tarjeta a concentraciones del 3 y 8% y ELISA competitiva; esta última es diseñada para bovinos. Para ello se utilizaron 1570 sueros de cerdos adultos de ambos sexos, 293 procedentes de 10 granjas de Sonora, 695 originarios de 2 granjas y 2 rastros de Sonora, y 695 de 15 granjas de Tlaxcala y del rastro ABC. Se detectó la presencia de anticuerpos contra brucelas lisas. La prueba de tarjeta al 3% proporcionó 211 reactores positivos lo que nos indica que es más sensible que al 8% , ya que ésta solo detectó 44 positivos pero a la prueba de tarjeta no se le confiere alta seguridad ya que existen varias reacciones cruzadas. El suero del cerdo tiene una marcada acción anticomplementaria, pero a pesar de lo mencionado se obtuvieron 52 sueros positivos y 178 negativos es por esto que la FC es poco confiable. Y por último la ELISA competitiva no es adecuada para el diagnóstico de brucelosis en cerdos ya que no hubo reactores positivos

Con lo observado es recomendable estandarizar pruebas de fácil aplicación para el diagnóstico serológico en cerdos.

3

**DETECCION DE ANTICUERPOS CONTRA *BRUCELLA SPP* EN
CERDOS DE ABASTO CON LAS PRUEBAS DE TARJETA, FIJACION DE
COMPLEMENTO Y ELISA COMPETITIVA**

INTRODUCCION

La brucelosis es una zoonosis causada por microorganismos del género *Brucella* que además de ser un serio problema de salud pública, provoca graves pérdidas económicas por disminución en la producción tanto de bovinos, caprinos, ovinos y cerdos.^{1,13, 22, 29,30} Desde el punto de vista médico, económico y de salud pública, la frecuencia de la enfermedad en los humanos, su duración y sus secuelas, el diagnóstico y el tratamiento, suponen elevados costos directos e indirectos. Si a ello se suman las pérdidas económicas que ocasiona la brucelosis animal, se comprende que en los países con una alta endemia, como el nuestro, la repercusión económica se estima en muchos miles de millones de pesos.⁵ Las especies patógenas para el humano son *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. canis* y *B. suis*.²⁶ En México la mortalidad por brucelosis en humanos es poco frecuente, debido a las características y evolución de la enfermedad, ya que es difícil que el médico que certifica una defunción, identifique a la brucelosis como causa básica pues la muerte, cuando ocurre, sobreviene por las complicaciones de la enfermedad.

No obstante en el decenio 1981-1990 en México se registraron 367 defunciones por brucelosis, aunque es una cifra baja comparada con otras causas

de muerte, se resalta pues se trata de una enfermedad controlable y curable

18,24,47

En América Latina prevalece *B. suis* biotipo 1 y 3 ocasionando numerosos casos en humanos. Por ejemplo en Argentina, García-Carrillo(1987) reportó aislamiento de diferentes especies de brucelas en humanos durante los años 1965-1983 en donde encontró lo siguiente, 49 casos por *B. abortus*; 19 casos por *B. melitensis* y 79 casos por *B. suis*.¹⁷

En México solo se tienen documentados dos casos de *B. suis* en humano, en 1992, uno encontrado en Puebla y otro en Zacatecas.* Actualmente en los Estados Unidos de América, la mayoría de los casos en humanos son ocasionados por *B. suis*; esto en trabajadores de rastros.⁴ En humanos *Brucella spp* daña al sistema fagocítico -mononuclear, produciendo, en una fase inicial un cuadro febril recurrente inespecífico y que, si no es atendido adecuadamente, puede complicarse con diversos procesos supurativos y puede desencadenar la muerte. La *Brucella suis* genera en el hombre cuadros artríticos y supurativos.

5,17,24

Brucella es un coccobacilo intracelular, Gram negativo, inmóvil, aerobio, que no forma esporas y no poseen cápsula. La mayoría de las especies son catalasa y oxidasa positivas, teniendo efecto hidrolizante sobre urea. La membrana externa contiene el lipopolisacárido (LPS) el cual se considera el componente antigénico principal que reacciona en pruebas serológicas^{6,8,11,12,41}.

* Comunicación personal de la Dra Aide López Merino Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica (INIREF).

El género *Brucella* se encuentra constituido por 6 especies reconocidas las cuales son: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. neotomae* y *B. suis*. Estas presentan colonias lisas, en tanto *B. ovis* y *B. canis* presentan colonias rugosa ^{1,17,25} Las primeras muestran reacción cruzada con otras bacterias, esto se debe a su antígeno principal, el Lipopolisacárido ((LPS). ^{2,11,14,18,23,36,41,43}

La *Brucella abortus* cuenta con 9 biotipos; *Brucella melitensis* con 3 biotipos, *Brucella suis* se encuentra constituida por 4 biotipos ^{1,3,43}: *Brucella ovis* es el agente etiológico de la epididimitis del carnero; *Brucella canis*, que produce en los perros orquitis y epididimitis, *Brucella neotomae*, que se aisló en la rata selvática del desierto que habita en los Estados Unidos.

La brucelosis porcina es conocida como aborto contagioso, infeccioso o enfermedad de Traum. ^{10,13,17,35} Es una enfermedad de tipo reproductivo la cual es causada generalmente por *Brucella suis*, pero al contacto con bovinos infectados; el cerdo se puede contagiar con *B. abortus* produciéndose una enfermedad asintomática, localizándose la bacteria en nódulos linfáticos ⁹. De la misma manera *B. suis* infecta a bovinos; en recientes estudios se ha observado que este microorganismo puede infectar la ubre de vacas productoras de leche dando como resultado grandes y extensivas epidemias de brucelosis en humanos. ^{4,27}

Brucella suis fue reconocida como entidad infecciosa específica a partir de 1914 cuando Traum la aisló de fetos de porcinos abortados. ^{23,27} Se ha observado que en granjas porcinas libres de brucelosis se encuentran resultados positivos en las pruebas serológicas, esto posiblemente se deba a su conocida reacción

cruzada que tiene *Brucella* con *Yersinia enterocolitica* 0/9^{15, 21, 23, 34, 39} ya que la cadena O de los lipopolisacáridos de ambos es muy parecida. Se ha observado que este fenómeno ocurre con algunos otros microorganismos tales como serotipos de *Salmonella*, *Pseudomonas spp* y *E. coli*^{14, 34, 40}

Brucella suis se encuentra constituida por 4 biotipos de los cuales los biotipos 1, 2 y 3 son patógenos a los cerdos en tanto el biotipo 4 afecta a los renos. El biotipo 2 se localiza en Europa donde sus hospedadores son la liebre y el cerdo, en tanto el biotipo 2 provoca importantes brotes en los suínos además produce una brucelosis milliar en el útero.^{1, 2, 4, 7, 9, 11, 38, 45} En México es más común el biotipo 1 y a nivel mundial el biotipo 3^{13, 27, 28, 31}. *B. suis* muere a 62.7 °C durante 10 minutos y es destruida por los rayos del sol en 2-4 horas. Puede sobrevivir en la orina y heces hasta por un mes; en el agua y suelo hasta por cuatro meses durante el invierno y menos tiempo en el verano. Es resistente a la salazón y el ahumado⁴.

La brucelosis porcina es una enfermedad crónica que puede pasar inadvertida, se caracteriza por producir abortos, que puede afectar a cerdos de cualquier edad.^{3, 4, 9, 16, 17, 24, 32}

La manera en que *Brucella* entra a una granja libre es generalmente con la introducción de animales infectados, tanto machos como hembras, monta directa de sementales enfermos e inseminación artificial mal controlada^{27, 36}. Pero la principal vía de entrada es la oral, por la ingestión de alimentos contaminados con secreciones de animales enfermos.^{3, 9, 37} Los lechones pueden infectarse al beber

el calostro de cerdas infectadas pero generalmente la mayoría se recupera antes de alcanzar la madurez sexual ⁴.

La bacteremia es el primer signo de la enfermedad la cual dura de 1 a 34 semanas según Casas ⁴ y Deyoe ⁹ menciona que la bacteremia es de 5 semanas a 35 meses o más. Las manifestaciones clínicas en las hembras son generalmente aborto, infertilidad, cerdas repetidoras, mortinatos y lechones nacidos débiles. También se puede presentar endometritis y abundante flujo vaginal sanguinolento. La bacteria se elimina por este medio, durante 30 a 90 días
1,4,9,13,32,33

Las placentas lesionadas pueden estar hiperémicas y edematosas con flujo grisáceo. Los fetos abortados presentan hemorragias subcutáneas y contenido estomacal amarillento. Los abortos pueden presentarse en cualquier momento de la gestación, pero cuando se observan en el último tercio de la gestación se asocia a hembras que adquirieron la enfermedad después de los 35 a 45 días de preñez ^{4,6,29,30}.

En los verracos se pueden producir a las 7 semanas de la infección orquitis y epididimitis y si la infección persiste se presenta artritis, cojera; y necrosis de cuerpos vertebrales de la región lumbar. Esto ultimo generalmente se debe a la tendencia de formar abscesos en esta región y linfadenopatías ^{20,27,33,44}. El pico de producción de anticuerpos es generalmente después de tres semanas. Los títulos más altos y persistentes aparecen con mayor frecuencia en los animales

adultos y la mayoría de estos muestran títulos de 1:100 o mayores con las pruebas de aglutinación en placa y de tubo ^{4,8,7}.

La brucelosis es una enfermedad que ofrece el mayor número de pruebas diagnósticas para su detección ¹¹. El diagnóstico definitivo de la enfermedad es el aislamiento del germen a partir de sangre, exudados, tejido de fetos abortados, linfonodos, placenta y semen pero esto resulta problemático ya que se requiere para su realización de personal calificado. En cuanto al diagnóstico serológico de la brucelosis en cerdos, se tienen algunas limitantes, ya que existen animales no infectados que pueden presentar anticuerpos aglutinantes, que se les atribuye a IgG heteroespecíficos. En animales infectados pueden presentarse resultados serológicos negativos debido a que se presentan en la etapa inicial de la infección, también a que los anticuerpos séricos tienden a desaparecer rápidamente o a la presencia de anticuerpos incompletos o defectivos los cuales no poseen capacidad aglutinante, es por eso que el diagnóstico debe de efectuarse a nivel de pira no en forma individual ^{10,12,39,40,41,46,49,50}.

En la práctica se realizan pruebas de seroaglutinación tanto en placa como en tubo, donde se consideran como positivos los títulos mayores ó igual a 100 U./ml y como negativo los títulos 50 U./ml o menor, no existe categoría de sospechosos. Estos son los métodos más utilizados para el diagnóstico serológico de la enfermedad ^{4,11,39,45}. En la prueba de aglutinación en tubo, existe un fenómeno llamado prozona y se presenta en algunos sueros que aglutinan en diluciones altas (1:100 y 1:200) y no se detectan en aglutinaciones bajas (1:25 y

1:50). Esto se debe a la presencia de anticuerpos incompletos, los cuales se están produciendo en el transcurso del proceso infeccioso , que bloquea a los anticuerpos completos cuando se fijan al antígeno⁵.

Las pruebas de rutina autorizadas por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural para la Campaña de Brucelosis son: Para bovinos, prueba de tarjeta a ambas concentraciones , prueba de rivanol, prueba de fijación de complemento y prueba de anillo de leche. Para ganado caprino prueba de tarjeta al 3% y al 8%, también fijación de complemento; En cerdos se utiliza principalmente la prueba de tarjeta al 8%^{12,28}.

La prueba de tarjeta es práctica, sensible y hasta la fecha es el mejor método de diagnóstico para brucelosis porcina; sin embargo el número de falsos positivos es alto por las conocidas reacciones cruzadas.^{8,10,40,49} Esta prueba en otras especies se ha comprobado que funciona adecuadamente ya que las aglutinaciones inespecíficas desaparecen al pH 3.6. Esta observación es la base de la prueba de tarjeta en la que se emplea un antígeno celular teñido con rosa de bengala y bufferado. Es un procedimiento cualitativo rápido de aglutinación macroscópica que se efectúa en una sola dilución. En la prueba de tarjeta, la estructura frente a la cual reaccionan los anticuerpos es el Lipopolisacárido (LPS)^{8,11,30}

Existen otro tipo de pruebas llamadas complementarias y se caracterizan por ser más sensibles y disminuyen las reacciones inespecíficas, las cuales son: prueba de mercaptoetanol, prueba de Coombs, pruebas inmunoenzimáticas

llamadas ELISA ^{11,39}, prueba de fijación de complemento (FC). Esta última se le considera la más específica aunque uno de los problemas más frecuentes al realizar la FC es la actividad anticomplementaria que se encuentra en el suero problema. El suero del cerdo presenta una actividad anticomplementaria, es decir que acentúa la actividad hemolítica del complemento agregado. Por eso es difícil hacer pruebas de FC con el suero de esta especie ^{14,27,28,31,36,40}.

La FC es una prueba laboriosa difícil de estandarizar y no puede realizarse con sueros hemolizados o con poder anticomplementario. Como es conocido, los anticuerpos cuando reaccionan con el antígeno, pueden activar el conjunto de proteínas séricas que conocemos como complemento, y algunos componentes de cuyos pueden actuar como hemolisinas. Este hecho se demuestra con la FC la cual se realiza en dos etapas : a) Reacción Antígeno- Anticuerpo, cuando se produce la reacción entre los anticuerpos y la suspensión bacteriana que es el antígeno, el complemento añadido en cantidad previamente determinada se consume (se fija) en mayor o menor grado dependiendo de la cantidad de anticuerpos específicos. b) Visualización de la reacción : Se añade anticuerpos anti-hematies de carnero y hematies de carnero. Si se queda el complemento sin fijar en la primera fase los hematies se hemolizan por tanto la reacción será negativa (no consumo de complemento en la primera fase). Cuando hay ausencia de hemólisis indica la existencia de IgM o IgG , específicos anti-LPS de *Brucella* ¹¹.

En épocas recientes se ha trabajado en el establecimiento de técnicas inmunoenzimáticas para el diagnóstico de la brucelosis, dentro de estas están los

inmunoensayos de tipo competitivos con anticuerpos monoclonales, dirigidos a un epítotope del antígeno O del lipopolisacárido. Esta prueba diseñada para bovinos detecta anticuerpos específicos de *B. abortus* en suero o plasma, además de que puede diferenciar animales infectados, de animales vacunados con la cepa 19* .

El tratamiento para esta enfermedad no es práctico ni económicamente rentable⁴⁷. Se desconoce el control mediante la vacunación en México, sin embargo, en China se ha utilizado con buenos resultados la vacuna producida por el biotipo 2 de *Brucella suis* para la inmunización de ovinos, caprinos, bovinos y cerdos⁴⁸.

El programa de hatos en control de la Campaña Nacional contra la Brucelosis en bovinos y caprinos cuenta con tres estrategias:

- 1 Hato en control-erradicación: que consiste en realizar la prueba diagnóstica identificación de reactivos, sacrificio o aislamiento de ellos y vacunación de animales jóvenes y adultos.
- 2 Hato en control- intensivo: consiste en realizar la prueba diagnóstica, identificación de reactivos y vacunación: de animales jóvenes y adultos.
- 3 Hato en control- vacunación: en el cual se realiza vacunación de animales jóvenes y adultos.²⁸

Este programa se orienta a las especies bovina y caprina, dentro de la Norma no se hace referencia a estrategias específicas para los porcinos.

* Comunicación personal del Dr. I. Adams¹, Alfonso² y Suárez³
 1 Depto de Patología Universidad de Texas, A & M
 2 Depto de Microbiología e Inmunología FMVZ UNAM

Las actividades de la Campaña en relación a ovinos y porcinos, serán consideradas de acuerdo a las disposiciones que la Comisión de Brucelosis juzgue convenientes ²⁸.

En México las pruebas de diagnóstico en *Brucella* son orientadas principalmente a bovinos sin tomar en cuenta que los porcinos también son especies susceptibles es por eso la necesidad de buscar pruebas diagnósticas efectivas para esta especie.

HIPOTESIS

Existen anticuerpos contra brucelas lisas en los cerdos para abasto que pueden ser detectados con las pruebas de Tarjeta Rosa de Bengala a concentraciones del 3% y 6%, Fijación de Complemento (FC) y ELISA competitiva (ELISA c)

OBJETIVOS

1. Determinar la presencia de anticuerpos contra *Brucella* spp en cerdos.
2. Utilizar la prueba de fijación de complemento y prueba de tarjeta a diferentes concentraciones (3% y 8%) para el diagnóstico de la brucelosis en cerdos
3. Evaluar un inmunoensayo enzimático de tipo competitivo diseñado para bovinos en el diagnóstico de la brucelosis en cerdos

MATERIAL Y METODOS

De dos bancos de sueros, se dispusieron de 1570 sueros, de los cuales, 293 eran procedentes de 10 granjas de Sonora, 695 originarios de 2 granjas y 2 rastros de Sinaloa. Estos sueros los proporcionó el Centro Nacional de Salud Animal. (CENASA), Tecamac, S.A.G.A.D.R.(Secretaria de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural)del segundo banco de sueros, 605 eran procedentes de 15 granjas del estado de Tlaxcala y del rastro ABC pertenecientes a cerdos adultos. El resto fueron proporcionados por el proyecto de enfermedades virales del cerdo del Instituto Nacional de investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP, S.A.G.A.D.R).

A todos los sueros se les realizó como prueba tamiz la prueba de tarjeta por duplicado a diferentes concentraciones 8% y 3% ². El antígeno estandar de esta prueba se preparó a partir de *Brucella abortus* 119-3 ²² de PRONABIVE (Productora Nacional de Biológicos Veterinarios) teñido con rosa de bengala. Esta prueba se realizó como tamiz para seleccionar a los sueros positivos, a cualquiera de las dos concentraciones.

La prueba de FC y ELISA competitiva* se aplicó a los sueros que resultaron positivos a cualquier de las dos concentraciones celulares en la prueba de tarjeta.

En la prueba de fijación de complemento se tomaron como positivos los sueros cuyos títulos fueron $> 1:4$.

*SYNTHETICS CORPORATION D-TEC BRUCELLA A TEST KIT DIAGNOSTIC.

En tanto la prueba de ELISA competitiva los resultados se determinaron con la siguiente escala:

% Inhibición

<40% Negativo

>40% y < ó = 70% Sospechoso

>70% Positivo

RESULTADOS

En la prueba de tarjeta al 3% se observó un 13.43% (211/1570) de sueros positivos . Cuando se utilizó a una concentración celular del 8% resultó positivo un 2.8% (44/1570), 25 de ellos fueron positivos a ambas pruebas (Cuadro No. 1). Este cuadro muestra que 230 sueros fueron positivos. Esto es que 211 sueros positivos a la prueba de tarjeta al 3% se le suman los 44 que lo fueron a la prueba de tarjeta al 8% dando un resultado de 255 sueros positivos , pero se les restan los 25 que lo fueron a ambas pruebas por lo que nos resulta un total de 230 sueros positivos . La prueba de tarjeta se realizó como tamiz y los 230 positivos se les realizó la prueba de fijación de complemento y ELISA.competitiva

En la FC resultaron positivos, un 23.91%, es decir 52 de 230 sueros positivos (Cuadro No.2).

De los 211 sueros positivos a la prueba de tarjeta al 3%, se obtuvieron 47 positivos a FC.

De los 44 sueros positivos a la prueba de tarjeta al 8% solamente 2 fueron positivos a la FC y unicamente 3 lo fueron a la 3 pruebas.(Cuadro No.3).

Este cuadro muestra la correlación que tiene la prueba de FC y ELISA competitiva con las pruebas de tarjeta al 3% y 8%,resultando más significativa la prueba de tarjeta al 3% con respecto a la FC. Esto nos indica que la prueba de tarjeta al 3% proporciona mas reactores positivos que la prueba de tarjeta al 8%. A los 230 sueros positivos a la prueba de tarjeta en ambas concentraciones se les

aplicó la prueba de ELISA competitiva , resultando negativos todos los sueros muestreados También se encontraron un total de 38 sueros anticomplementarios.

CUADRO No.1

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE TARJETA AL 3% Y 8%

	PRUEBA DE TARJETA AL 3%	PRUEBA DE TARJETA AL 8%	AMBAS PRUEBAS
POSITIVOS	211	44	25
NEGATIVOS	1359	1528	1545
TOTAL	1570	1570	1570

CUADRO No.2.

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE FC Y ELISA_c

	FIJACION DE COMPLEMENTO	ELISA competitiva
TOTAL DE SUEROS MUESTREADOS	230	230
TOTAL DE SUEROS POSITIVOS	52	0
TOTAL DE SUEROS NEGATIVOS	178	230

CUADRO No. 3**CORRELACION ENTRE PRUEBAS**

	POSITIVOS A FIJACION DE COMPLEMENTO	POSITIVOS A ELISA competitiva
PRUEBA DE TARJETA AL 3%	47	0
PRUEBA DE TARJETA AL 6%	2	0
AMBAS PRUEBAS	3	0

DISCUSION

En el presente trabajo se utilizó la prueba de tarjeta con antígeno de *Brucella abortus* en concentración celular del 3% y 8% . Esta prueba es recomendada como tamiz en la Norma Oficial Mexicana para caprinos y bovinos. Como prueba confirmatoria se utilizó la de Fijación de Complemento (FC), además se utilizó un inmunoensayo enzimático de tipo competitivo diseñado específicamente para el diagnóstico de brucelosis en bovinos.

Los resultados tanto en la prueba de tarjeta como FC destacan la presencia de anticuerpos contra *Brucella* en el suero de los animales analizados por Giles¹⁴ y Rodríguez²⁶ quienes encontraron reactores positivos en granjas de diferentes estados de la República Mexicana

De los 1570 sueros muestreados 211 fueron positivos a la prueba de tarjeta al 3% y de estos, se obtuvieron 47 positivos a FC, mientras que los 44 que lo fueron al 8% solo 2 lo fueron a la FC. Esto nos indica una mayor relación entre la prueba de tarjeta al 3% y la de FC. Sin embargo, 164 sueros positivos a la prueba de tarjeta al 3% resultaron negativos a la FC. Esto es debido a que el suero del cerdo presenta reacciones heteroespecíficas, dando falsos positivos. También se debe considerar que existen reacciones serológicas cruzadas principalmente con algunas cepas de *Yersinia enterocolitica* y con *Franciella tularensis*^{10,14,40}. Estas se manifiestan cuando cerdos no infectados tienen aglutininas heteroespecíficas a brucela de tipo IgM. En una infección por brucela

aparecen anticuerpos IgM e IgG pero los primeros son mas tempranos y persistentes por más tiempo.

La prueba de tarjeta es una prueba cualitativa y se usa rutinariamente a concentración del 8%, sin embargo recientemente se ha encontrado que en ovinos y caprinos, la concentración del antígeno al 3% aporta resultados más confiables al aumentar la sensibilidad. Esto puede explicarse por el fenómeno de equivalencia entre el antígeno y el anticuerpo³⁹. Ya que cuando se agrega el antígeno en exceso se forma poco precipitado, cada molécula de anticuerpo se une a un par de moléculas de antígeno.

Davis¹⁴ estudio un total de 22162 sueros y encontró una sensibilidad alta de la prueba de tarjeta y una correlación alta de FC (97%).

En este estudio se obtuvo una diferente correlación según la concentración, entre la prueba de tarjeta y la FC, coincidiendo con el trabajo antes mencionado esto en la prueba de tarjeta pero no en la FC.

Peyer et al.³⁶ utilizaron 16 cerdos de entre 68 y 80 Kg infectándolos con *Brucella suis* y muestreándolos entre 4 y 40 días post infección concluyeron que la prueba de tarjeta es mejor que la FC, por que a esta última le falta una estandarización en cerdos. Este trabajo esta de acuerdo con lo anterior, ya que en los resultados se obtuvieron 211 sueros positivos a tarjeta al 3% y 44 al 8% en tanto con la FC solo 52 sueros fueron positivos de los 230 muestreados.

Rogers et al.²⁷ aplicaron las pruebas de rosa de bengala, fijación de complemento y aglutinación en tubo (TAT) en 345 cerdos salvajes y 80

domésticos. Los tejidos de los cerdos fueron cultivados para tratar de aislar *Brucella suis* siendo 93 cerdos fueron positivos al cultivo. La sensibilidad en cultivos positivos de la prueba rosa de bengala (79.1%) fue mas significativa que la FC (49.1%) y a TAT (51.1%)

Los resultados de este estudio tienen una relación significativa con los anteriores resultados. Aunque no fue posible realizar el aislamiento del germen ya que las muestras provenian de bancos de sueros.

García *et al.*¹⁷ corrieron 7 pruebas serológicas a 26 cerdas infectadas experimentalmente con *Brucella suis* las pruebas que corrieron fueron : aglutinación en placa, en tubo, mercaeptanol, tarjeta y antiglobulina. De las cuales las mas sensibles fueron la de antioglobulina y la de fijación de complemento, que mostraron positividad en todos los casos menos en uno; los métodos de mercaptoetanol y tarjeta fueron poco sensibles detectando solo 10

Martínez ²⁰ estudió un total de 600 sueros y obtuvo 65.66% de reactores positivos. De este resultado, el 17.85% resultó positivo a la prueba de placa, el 12.5% a la prueba lenta en tubo y el 1.33% a la prueba de tarjeta.

En la literatura consultada, existe discrepancia entre los resultados de las investigaciones, esto podría deberse a la utilización de técnicas y antígenos diferentes, además que la mayoría de los casos no se realizó aislamiento bacteriano.

La ELISA competitiva utilizada, ha mostrado una gran eficacia en el diagnóstico de la brucelosis en bovinos en Estados Unidos y México; por lo que se

quizó conocer como trabajaba en el diagnóstico para cerdos y se obtuvieron resultados negativos. Esto se puede explicar por el diseño de la prueba en la cual se utilizó un epítipo del antígeno O del lipopolisacárido de *B. abortus* para hacer un anticuerpo monoclonal que pudiera competir con los anticuerpos producidos por los bovinos.

En el presente trabajo, estos sueros se mostraron negativos por lo que se concluye que los cerdos no son capaces de producir anticuerpos contra el epítipo O que es usado en el ensayo.

CONCLUSIONES

Se detectó la presencia de anticuerpos contra brucelas lisas en sueros de cerdos provenientes de Sonora, Sinaloa y Tlaxcala

En este estudio se concluye que la prueba de tarjeta al 3 % da más reactores positivos; lo que no quiere decir que el animal este enfermo dadas las inconveniencias de la prueba que al ser más sensible baja su especificidad, y no fue posible realizar el aislamiento del germen ya que las muestras provenían de bancos de sueros, por lo tanto no se puede asegurar que la prueba sea 100% confiable. Se ha observado que en ovinos y caprinos sí lo es, pero en los suinos sería recomendable una estandarización de la misma.

Sería recomendable realizar estudios en donde se obtenga el aislamiento del germen y así poder determinar la sensibilidad y especificidad de las pruebas serológicas a utilizar

La FC es una prueba clasificada como confirmatoria pero como ya se mencionó anteriormente el suero de cerdo tiene una marcada actividad anticomplementaria lo que la hace poco confiable

En cuanto a la prueba de ELISA competitiva de diseño para el diagnóstico de la brucelosis en bovinos, no es adecuada para el diagnóstico de brucelosis en cerdos, ya que no hubo ningún reactor positivo.

La Campaña Nacional contra Brucelosis de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural da mayor importancia a la brucelosis de otras especies animales dando poco énfasis a los porcinos, sabiendo que éste puede

ser un factor importante en la epidemiología de la enfermedad además de provocar casos en humanos ocasionandoles trastornos severos .

LITERATURA CITADA

1. Acha , P.N. y Szyfress. B.: Zoonosis y enfermedades comunes al hombre y a los animales 2ª ed **OPS/ OMS**, publicaciones científicas No, 503 . 1986.
2. Alton, G.; Jones, L.M, Angus, R.D.: Techniques for brucellosis laboratory. **INRA** , Paris 1988.
3. Blood, D.C, et al.: Medicina Veterinaria , 6ª Ed. **Interamericana**. Mexico D.F. 1986.
4. Casa, O.R.: Reseña de la brucelosis porcina **OPS/OMS**. 1991
5. Casillas, F.M.A.: Impacto de la brucelosis en la salud pública en México. **Memorias del II Foro Nacional sobre Brucelosis, UNAM CANIFARMA- SARH, México, 1988.**
6. Ciprián , C.A; Rodríguez , V.M.: Diagnóstico serológico de brucelosis y su interpretación. **Memorias del II Foro Nacional sobre brucelosis, UNAM-CANIFARMA- SARH, México, 1988.**
7. Cotrina, N. Fernández, A.: Brucelosis problema sanitario y económico. **Científica- Técnica. Habana 2:43 (1991).**
8. Davis, G.: The rose bengala test. **Vet. Rec. 88 : 447- 449 (1971)**
9. Deyoe, B.L.: Brucellosis. In Disease of swine Edited by Leman. **A Leman Iowa State University Press. 1986.**

10. Deyoe, B.L. and Manthei, C.A.: *Brucellosis in Diseases of Swine* 4^o Dunne, H.W. and Leman, A.D. Ed; **Iowa State University Press, Ames, 1975.**
11. Díaz, A. E; Suárez, G.F.: Diagnóstico de Brucelosis. Curso de capacitación para coordinadores estatales y supervisores distritales en tuberculosis bovina y brucelosis. **FMVZ 1994. 165-178. CONETB (1994)**
12. **FAO. OMS.** Comité de expertos en Brucelosis 5^o Informe. Serie de Informes Técnicos No. 464, Ginebra, 28 de Junio a 6 de julio de 1970 (publicado en 1972)
13. Flores, M.: Detección de anticuerpos séricos contra *Brucella suis* en cerdos de abasto por la técnica de ELISA. Tesis de licenciatura. **FMVZ UNAM. México, 1981**
14. Frye, G.H; Hyalytsvilla, M.D.: Swine Brucellosis A Vanishing disease. In **Proceedings United State Association. 87:137-141(1983)**
15. Fuentes, N.B. y Vazquez, M.R.: Aislamiento de *B. abortus* biotipo 3 a partir de un cerdo para abasto. **Vet. Mex: 16: 273-275 (1985).**
16. García, C.C.: La Brucelosis de los Animales en América y su relación con la Infección Humana. Editado por **Office International des epizooties, 207 O.I. E. Francia, 1987.**
17. García, C.C; Turovetzky, A. and Lucero, N.: Especies y biotipos de *Brucella* aislados del hombre en la Argentina , **Medicina (Buenos Aires), 45,20,1985.**

18. Giles, E.E.M: Titulación de anticuerpos contra brucelosis en cardos procedentes de granjas de diferentes Estados de la República Mexicana. Tesis de Licenciatura.: **FMVZ.UNAM, México.** 1993.
19. Herman, L. A and De Ridder, H.: Identification of Brucella spp by using the polymerase Chain reaccion. **App and Enviromental Microbiology.** 58: 2099-2102. (1992).
20. Hill, R.A; Cook D.R.: Protein profiles of Brucella suis and Brucella abortus in isoelectric focusing and sodium dodecyl sulphate- polycrymide gel electrophoresis. **Vet. Microbiology.** 39: 25-32 (1994)
21. Karpinski, T.M; Skuarek, P. and Zorawski.: Aglutinins cross-reacting with Brucella, Salmonella, Yersinia and Francisella antigens in serum of swine. **Medycyna Weteryna,**36: 394-396.(1986).
22. Kulkary, J.B; Khot, A.A. and Joshi, U.M.: Detection of Brucella antibodies in bovine by ELISA and its comparision with standard aglutination and Rose Bengala Plate Test, **Indian Vet. Med. J.** 15:4 (1991)
23. Lateer, M.A; Havibavu, Y.: Seroprevalence of porcine brucelosis among contry pigs in Adrapredesh. **Indian Vet. J.** 66: 4 (1991).
24. López, M.A.: Elaboración de antígeno para el diagnóstico uso e interpretación. Curso de capacitación de cordinadores estatales y supervisores distritales en tuberculosis bovina y brucelosis. **FMVZ.1994.CONETB** (1994).

ESTE TESIS NO DEBE
VALER DE LA BIBLIOTECA

- 25.**Luna, M.J.: Epidemiología de la Brucelosis y su repercusión en la Salud Pública. Curso de Capacitación para coordinadores estatales y supervisores distritales en tuberculosis bovina y brucelosis. **FMVZ 1994.** 165-178. **CONETB (1994)**
- 26.**Marín , C.M.T.: Sondeo serológico de brucelosis en 4 granjas porcinas mediante distintas pruebas diagnósticas . Tesis de licenciatura.**FMVZ. UNAM . 1989**
- 27.**Nielsen, K; Ducan, J.R. Animal Brucellosis. **CCR PRSS, USA 1990**
- 28.****Norma Oficial Mexicana.** Diario Oficial de la Federación del 23 de Enero de 1995.
- 29.**Martínez, L; Valdez, J.A; Román, J.L. y Rodríguez , M.: Ecosistemas de Brucelosis animal y humana en el municipio de Consolación del Sur del Pinal del Río. **Cien, Tec. Agric. 11:1 (1989).**
- 30.**Paolichi, F.A; Tezol, H.R and Campero, C.M.: Isolation of *Brucella suis* from a ram. **Veterinary records, 16 132 (1993).**
- 31.**Pauyer, J.B; Miller, C.D.; Hennager, S.C. and Ewalt, D.R.: Comparison of five serologic test and culture for brucellosis in swine experimentally infected with *Brucella suis* biovar 1. **Proceeding Anual Meeting of United States Animal Association. 94: 147-152. (1990).**
- 32.**Piojan, C. y Ramirez R.: Diagnóstico de las enfermedades del cerdo. Editado por **Piojan, C y Ramirez, R. México, 1982.**

- 33.**Rodríguez, V.H. : Determinación de anticuerpos contra brucelas lisas en cerdos en granjas de tres estados de la república mexicana. Tesis de licenciatura. **FMVZ: UNAM** (1995).
- 34.**Rogers, R.J; Cook, D.R; Ketterner, P.J.; Stewart, R.W.: An evaluation of three serological test for antibody to Brucella suis in pigs. **Aust. Vet. J.** **66:77-80.** (1989).
- 35.**Ruiz, C.M.: Obra científica selecta. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica. Secretaría de Salud. (1993).
- 36.**Romero , R.M.P.: Diagnóstico serológico comparativo de la brucelosis bovina y porcina mediante las pruebas de aglutinación lenta en tubo tarjeta y aglutinación en rosa de bengala a pH 7.0 . Tesis de licenciatura. **Universidad Veracruzana. Veracruz, Ver.** (1993).
- 37.**Salud Animal, publicación científica No. 1 . **Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, Costa Rica,** (1982).
- 38.**Serra, , Argote, Eº.J, Herrera, F.: Títulos inespecíficos de la brucelosis en porcinos . **Cienc. Tec.Agric.****1:1-2** (1979).
- 39.**Shrivatava, P.K; Tongaonkar, S. Murkherjee, F and Rana, S.K: A comperation of dot-enzyme- linked immunosorben assay (dot-ELISA) with other conventional test for serodiagnosis of bovine brucellosis. **Indian J. of Animal Sci.** **61:2** (1991).

40. Sing, D.F and Nrayaan, K.G.: Serological study of swine yersiniosis in farm. **J of animl Sci** 5:506-508 (1991).
41. Spender, A.S.; Brogton, E.S; Hamid, S and Young, D.B.: Immunoblot studies in the differential diagnosis of porcine brucellosis an immunodominant , 62K Da protein is related to the mycobacteria 65K Da heat Shook protein (HSP-65) **Vet. Microbiology**. **39**: 47-60 (1994).
42. Stuart, F.A; Cobel, M; Jand Brewer, R.A.: Experimental Brucella abortus infection in pigs. **Vet. Microbiology** 1: 365-375 (1987).
43. Suárez, F.G.: Descripción y generalidades de la brucelosis. Curso de capacitación para cordinadores estatales y supervisores distritales en tuberculosis bovina y brucelosis. FMVZ 1994. 165-178. **CONETB** (1994).
44. Taylor, D.J.: Enfermedades del cerdo, 2º de. **Manual Moderno México**. (1992).
45. Thoen, C.O; Charles, G.L.: Pathogenesis of bacterial Infection In Animals. **Iowa State University press Ames** (1986).
46. Tizard, Y.: Inmunología veterinaria . 3ª ed. Intersamericana, (1990).
47. Trejo, S.J.: La desinfección como medida contraepizootica en el control y erradicación de la brucelosis. Memorias del II Foro Nacional sobre Brucelosis, **UNAM- CANIFARMA- SARH, México**, (1988).
48. Verger, J.M; Grayon, M; Zundel, E; Lechopier, P and Oliver, B.V.: Comparition of the efficacy of *Brucella suis* strain 2 and *Brucella melitensis* Rev 1 live

vaccines against a *Brucella melitensis* experimental infection in pregnant ewes.

Vaccine. 13-2 191-196 (1995).

49. Wrathall, A.E; Broughton, K.P.W; Goldsmith, G.P.: Serological reactions to *Brucella* species in British pigs. **Vet. record.** 132:449-454. (1993).

50. Zymunt, M; Debarh, H.S; Cloeckaerta, A and Dubray, G.: Antibody response to *Brucella melitensis* outer membrane antigens in naturally infected and Rev 1 vaccinated sheep. **Vet. Microbiology.** 39:243-244 (1994).