

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS EN BOVINOS MEDIANTE LA
PRUEBA DE FLUORESCENCIA POLARIZADA**

POR:

Jouseph Jair Torres Tovar

Tesis

Presentada como requisito parcial para

Obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

**DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS EN BOVINOS MEDIANTE LA PRUEBA DE
FLUORESCENCIA POLARIZADA**

POR:

Jouseph Jair Torres Tovar

TESIS

**QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO EXAMINADOR
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

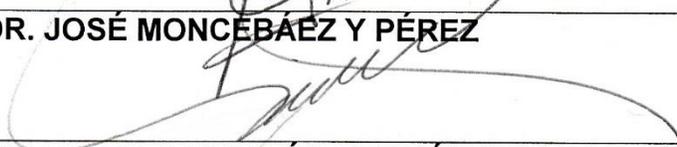
APROBADA POR

PRESIDENTE:



DRA. ILDA GRACIELA FERNÁNDEZ GARCÍA

VOCAL:



DR. JOSÉ MONCEBAÉZ Y PÉREZ

VOCAL:

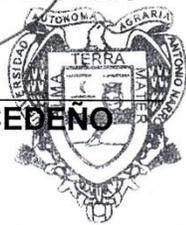


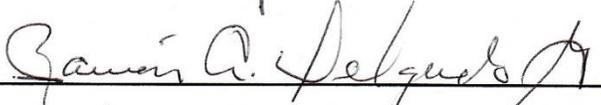
MC. MANUEL DE LEÓN HERNÁNDEZ VALENZUELA

**VOCAL
SUPLENTE:**



MVZ. EPAB. JOSÉ DE JESÚS QUINTERO CEDENO





MC. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ

Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

TORREON, COAHUILA

DICIEMBRE 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS EN BOVINOS MEDIANTE LA PRUEBA DE
FLUORESCENCIA POLARIZADA

POR:

Jouseph Jair Torres Tovar

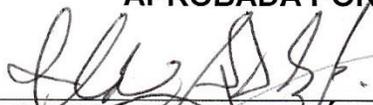
TESIS

QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL COMITÉ DE ASESORIA COMO
REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADA POR

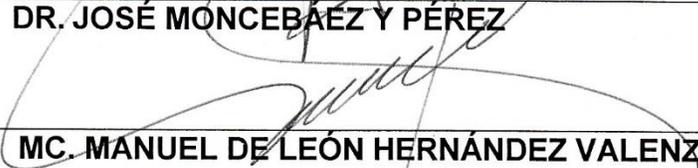
ASESOR
PRINSIPAL:


DRA. ILDA GRACIELA FERNÁNDEZ GARCÍA

ASESOR:

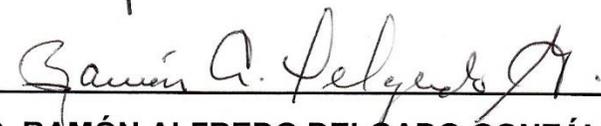

DR. JOSÉ MONCEBÁEZ Y PÉREZ

ASESOR:

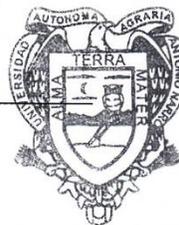

MC. MANUEL DE LEÓN HERNÁNDEZ VALENZUELA

ASESOR:


MVZ. EPAB. JOSÉ DE JESÚS QUINTERO CEDEÑO


MC. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

TORREON, COAHUILA

DICIEMBRE 2016

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, José Ramón Torres Piña y Lucero Diana Tovar Zamarripa por su amor y confianza, por haberme apoyado en mi formación académica para obtener mi título profesional.

A mis hermanos, José Ramón Torres Tovar y José Eduardo Torres Tovar por su amor, cariño y por apoyarme en cada momento.

A mis tíos, Laura Beatriz Torres Piña, Homero Páez García, Margarita Quezada Torres por brindarme su amor y apoyo para obtener este gran logro.

Al Dr. José de Jesús Quintero Cedeño, por brindarme todo su apoyo y confianza para ser parte de su proyecto para realizar mi tesis de titulación.

A la Dra. Ilda Graciela Fernández García, por apoyarme en la realización de mi tesis de licenciatura.

A los Médicos Veterinarios y Químicos del laboratorio, Dra. Alma Taurina Luna De Anda, MVZ Ricardo Antonio Pérez Brígido, MVZ Fermín Luna García, QFB Héctor Manuel Arreola Luna, QFB Marcela Escareño Fong, QFB Sanjuana Campos Mireles. A todos ellos por brindarme su conocimiento, su amistad y consejos, muchas gracias a todos.

A mis amigos, José Fernando de León Hernández, Griselda Aidé Vázquez Cavazos, Gustavo Piña Cadena, Sergio Favela Espino, Carlos Eduardo Arenivar Sepúlveda, Héctor Eduardo arenivar Quezada, Homero Páez Quezada. A todos ellos por su gran amistad y apoyo que me brindaron para este gran logro.

DEDICATORIAS

A Dios, por permitirme despertar día con día para lograr esta gran meta que me tracé desde pequeño.

A mis padres, José Ramón Torres Piña y Lucero Diana Tovar Zamarripa por su amor y confianza, por haberme apoyado en mi formación académica para obtener mi título profesional.

A mis hermanos, José Ramón Torres Tovar y José Eduardo Torres Tovar por su amor, cariño y por apoyarme en cada momento.

A mi abuela, Alicia Piña Benavides por todo su amor, cariño y consejos que me brido para lograr este gran logro.

A toda mi familia, gracias a cada uno de ustedes por ese apoyo que me brindaron cada consejo sirvió para obtener este gran logro, muchas gracias de todo corazón, y a los que estuvieron y siguen estando conmigo.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue diagnosticar la brucelosis en sueros de vacas Holstein mediante la prueba de fluorescencia polarizada. La prueba de fluorescencia polarizada posee mayor sensibilidad y especificidad que las técnicas rosa de bengala, rivanol y fijación de complemento en el diagnóstico de la brucelosis bovina. Se utilizaron 87 sueros de vacas Holstein de establos ubicados en la Comarca Lagunera. La prueba de fluorescencia polarizada indicó que 85 fueron positivos y 2 negativos, lo cual corresponde con 98% de sensibilidad y 2% de especificidad. Con la prueba de tarjeta los resultados indicaron 72 positivos y 15 negativos, correspondiendo a 83% de sensibilidad y 15 % de especificidad. Con la prueba de rivanol, se detectaron 72 positivos y 15 negativos, indicando un 83% de sensibilidad y 15 % de especificidad. Finalmente la prueba de fijación de complemento indicó 20 positivos y 67 negativos, correspondiendo a 22% de sensibilidad y 67% de especificidad. Se concluye que la prueba de fluorescencia polarizada posee la más alta sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de brucelosis bovina comparada con las pruebas tradicionales de tarjeta o rosa de bengala, rivanol y fijación de complemento.

Palabras clave: Fluorescencia polarizada, anticuerpos, *Brucella abortus*, rivanol, rosa de bengala, fijación de complemento.

ÍNDICE

	Pág
AGRADECIMIENTOS _____	i
DEDICATORIAS _____	ii
RESUMEN _____	iii
1. INTRODUCCIÓN _____	1
OBJETIVO _____	3
HIPÓTESIS _____	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA _____	4
2.1. Situación actual de la brucelosis en México _____	4
2.2. La brucelosis en los bovinos _____	4
2.3. Epidemiología de la brucelosis _____	5
2.4. Brucelosis caprina _____	6
2.5. Brucelosis en los porcinos _____	7
2.6. Brucelosis en humanos _____	8
2.7. Mecanismos de respuesta inmunitaria en la brucelosis _____	9
2.7.1. Respuesta inmune innata _____	9
2.7.2. Inmunidad Humoral _____	10
2.7.3. Inmunidad Celular _____	11
2.7.4. Citoquinas _____	11
2.7.5. Especies lisas y rugosas de <i>Brucella</i> _____	12
2.8. Pruebas oficiales en el diagnóstico de la brucelosis _____	13
2.8.1. Prueba de tarjeta o rosa de bengala _____	13
2.8.2. Prueba de precipitación con rivanol _____	14
2.8.2.1. Campo de aplicación _____	14
2.8.3. Prueba de fijación de complemento _____	14
2.8.4. Fluorescencia Polarizada _____	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS _____	17
3.1. Lugar del área de estudio _____	17
3.2. Metodología _____	17

3.2.1. Muestreo sanguíneo _____	17
3.2.2. Material _____	17
3.2.3. Toma de muestra de la vena coccígea _____	18
3.3. Transporte de sueros sanguíneos _____	19
3.4. Prueba de Tarjeta _____	19
3.5. Prueba de Rivanol _____	20
3.6. Fijación de Complemento _____	21
3.6.1. Dilución de las muestras de sueros problemas _____	26
3.6.2. Preparación de la solución de antígeno y complemento y su distribución en la microplaca de los sueros controles positivo y negativo y en los sueros a analizar. _____	26
3.6.3. Agregado del sistema hemolítico _____	27
3.6.4. Segunda incubación en caliente (igual a la anterior) _____	27
3.6.5. Cálculos y expresión de los resultados _____	27
3.6.6. Reacción positiva _____	28
3.6.7. Interpretación de los resultados _____	28
3.7. Florescencia Polarizada _____	29
3.8. Análisis de datos _____	34
4. RESULTADOS _____	37
5. DISCUSIÓN _____	38
6. CONCLUSIÓN _____	40
7. LITERATURA CITADA _____	41

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág
Tabla 1 Cuadro de contingencia de sensibilidad y especificidad. La sensibilidad es la capacidad de la prueba para detectar la enfermedad en animales enfermos. La especificidad indica la capacidad de la prueba para detectar la ausencia de la enfermedad en sujetos sanos	34
Tabla 2 Diagnóstico de Brucelosis mediante las pruebas Florescencia Polarizada, Tarjeta o Rosa de Bengala, Rivanol y Fijación de Complemento, realizada en sueros de bovinos en hatos de la Comarca Lagunera	37

1. INTRODUCCIÓN

En México el ganado bovino se destina para producción de leche, carne y doble propósito, representados por más de 30 razas o cruza de bovinos para la producción de carne y leche. Tomando en cuenta sus características de adaptación, las diferentes razas se distribuyen de acuerdo al clima de cada región que tiene nuestro país, el cual determina fundamentalmente el nivel de desarrollo y el propósito del hato ganadero. Uno de los sistemas de producción lechera en el México es el especializado, en este sistema el ganado se desarrolla con altos niveles de tecnología, este sistema incluye principalmente a la raza Holstein, y en menor medida a las razas Pardo Suiza y Jersey. El sistema especializado concentra el 50.6% de la producción total de leche que se produce en México (Programa Nacional Pecuario, SAGARPA).

Una de las regiones de México es la Comarca Lagunera en los estados de Coahuila y Durango esta región en particular posee un inventario de 452 175 cabezas de ganado bovino con 247 301 vacas en producción (Subdelegación de Ganadería, Delegación en la Región Lagunera, 2015). La población de ganado bovino antes mencionada se concentra en Durango los municipios de Gómez Palacio, Lerdo y Tlahualilo de Zaragoza, y en Coahuila, en los municipios de Torreón, Matamoros, San Pedro de las Colonias, Francisco I. Madero y Viesca, en un radio aproximado de 150 km.

El ganado bovino lechero es susceptible de sufrir enfermedades ocasionadas por trastornos nutricionales, virales, bacterianos, entre otros, o por alteraciones

provocadas por el medio ambiente como el estrés calórico. Una de las enfermedades bacterianas que se presentan con mayor frecuencia en el ganado bovino es brucelosis. La brucelosis es una enfermedad zoonótica ocasionada por bacterias del género *Brucella*, donde el contagio directo es con las placentas, con los fetos, o con las secreciones uterinas y por el consumo de alimentos contaminados, principalmente leche y sus derivados (Rojas et al., 2004; Samartino et al., 2007).

La Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO, Campaña Nacional, contra la Brucelosis en los animales, establece como pruebas oficiales para el diagnóstico de la brucelosis al antígeno amortiguado rosa de bengala o prueba de tarjeta, a la prueba de precipitación con rivanol, y a la prueba de fijación de complemento. Sin embargo, actualmente se encuentra disponible otra técnica de laboratorio para el diagnóstico de brucelosis, la fluorescencia polarizada. La fluorescencia polarizada ha demostrado ser eficiente en el diagnóstico de brucelosis por presentar alta sensibilidad y especificidad, además de la facilidad en el manejo de las muestras y la rapidez en los resultados (Dajer et al., 1999; Rojas et al., 2004).

Por ello, el objetivo en la presente estudio fue aplicar la técnica y diagnosticar la brucelosis en vacas Holstein mediante la prueba de fluorescencia polarizada.

OBJETIVO

Diagnosticar la brucelosis en sueros de vacas Holstein mediante la prueba de fluorescencia polarizada.

HIPÓTESIS

La fluorescencia polarizada posee mayor sensibilidad y especificidad que las técnicas rosa de bengala, rivanol y fijación de complemento en el diagnóstico de la brucelosis bovina.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Situación actual de la brucelosis en México

Las enfermedades infecciosas impactan negativamente en la productividad pecuaria del país. Entre estas enfermedades, destaca la brucelosis la cual ocasiona graves pérdidas por fallas reproductivas, abortos con pérdida económicas considerables, así como por las restricciones aplicadas tanto a los animales infectados como a los productos de éstos. Esta enfermedad es considerada como la zoonosis bacteriana más importante en México (Aguilar et al., 2011).

En México hay 30 millones de bovinos, de los cuales aproximadamente el 5.7% tiene brucelosis, además, en el país se presentan aproximadamente 2 000 casos de fiebre de Malta en humanos por año. Para contrarrestar las estadísticas anteriores, es necesario desarrollar y adaptar pruebas de diagnóstico que sean más específicas y sensibles, y que puedan diferenciar los anticuerpos inducidos por la inmunización de los anticuerpos que son producidos en la infección de campo (Ramírez et al., 2009).

2.2. La brucelosis en los bovinos

La brucelosis bovina es una enfermedad causada por la bacteria *Brucella abortus*, que provoca abortos con pérdida económicas considerables. El impacto económico que tiene en las empresas pecuarias es considerablemente alto, debido a la reducción en la fertilidad del hato, en el gran número de abortos, en el

nacimiento de becerros débiles, en el bajo peso al destete y la disminución en la producción de leche (Dájer et al., 2003).

El signo predominante en las hembras preñadas e infectadas de brucelosis, es el aborto o el nacimiento prematuro o a término de terneros muertos o débiles. El aborto se presenta de forma espontánea, entre el quinto y el noveno mes de gestación, a veces con retención placentaria y en consecuencia, una metritis que puede ser causa de infertilidad permanente. En los casos en que no se presenta el aborto, la excreción del agente etiológico se puede producir a través de la placenta, por los fluidos fetales y por las descargas vaginales de animales infectados. Cuando la infección se localiza en la glándula mamaria o en los ganglios supramamarios, entonces las bacterias de *Brucella* se eliminan en la leche de forma constante o intermitente. En las hembras no preñadas la enfermedad presenta un curso asintomático, pero los animales quedan infectados de por vida (Ortiz et al., 2007).

2.3. Epidemiología de la brucelosis

La brucelosis es una de las zoonosis de mayor distribución a nivel mundial. Esta enfermedad es de gran importancia tanto en la salud pública como en la producción pecuaria, constituyendo una barrera para el comercio de animales y de los subproductos de origen animal, lo cual afecta la economía de los países que no han podido erradicar la misma (Ortiz et al., 2007).

La principal vía de entrada de la *Brucella* es la oral, por la ingestión de alimento o agua contaminados por las secreciones o por restos de abortos de vacas infectadas, o bien por el lamido de las secreciones vaginales, los genitales, los fetos abortados y los becerros recién nacidos de vacas infectadas. No se considera que

la vía venérea tenga importancia epidemiológica en la transmisión de la enfermedad, pero si el semen infectado que es utilizado en la inseminación artificial. La leche es una forma natural de eliminación de *Brucella* en las vacas infectadas y es trascendental en la transmisión al becerro. En los establos lecheros, otra forma de contagio que debe tenerse en cuenta es el ordeño, ya que como la bacteria se elimina en la leche, si se utilizan las mismas copas para el ordeño de varias vacas es muy probable que la bacteria se transmita entre estos animales, por lo que se recomienda ordeñar primero a las vacas sanas y dejar para el final las vacas infectadas (Tique et al., 2009).

La transmisión vertical es de un 60% al 70% en los fetos nacidos de madres infectadas ya nacen con la infección. Las becerras también pueden resultar infectadas durante el nacimiento en el momento de atravesar el canal del parto, o bien al amamantarse con calostro o leche de vacas infectadas. La mayoría de estas becerras se quedan libres de *Brucella* y un porcentaje bajo puede mantenerse infectadas hasta la adultez, permaneciendo negativas a las pruebas serológicas de diagnóstico y abortando en la primera gestación (Díaz, 2013).

2.4. Brucelosis caprina

La brucelosis caprina es producida casi siempre por *Brucella melitensis*, aunque en algunos casos también puede estar causada por la *Brucella abortus* de los bovinos. La brucelosis caprina se caracteriza por presentar curso insidioso y de evolución generalmente crónica. Los síntomas principales son: aborto, fiebre

ondulante pertinaz y procesos patológicos localizados en los órganos genitales de las hembras y machos, así como en las articulaciones (Russo et al., 2015).

La brucelosis caprina, en el macho rara vez se presenta orquitis o epididimitis. Las secreciones que eliminan las cabras infectadas durante el parto o el aborto contaminan el alimento y el agua, que al ser ingeridos por los animales susceptibles penetran al organismo por vía oral, o por vía conjuntival mediante aerosoles. La transmisión vertical de la *Brucella* a las crías ocurre durante el parto o en la lactación. En México la seroprevalencia varía entre regiones, llegando a alcanzar valores hasta del 40%, pero sin causar muertes (OIE, 2004).

2.5. Brucelosis en los porcinos

La brucelosis en los cerdos está causada por *Brucella suis*. Esta infección bacteriana, después de una bacteriemia inicial, causa lesiones inflamatorias crónicas en los órganos reproductores de ambos sexos, con localización y lesiones ocasionales en otros tejidos. En las hembras, invade las placentas y los fetos, en tanto que en los machos, la invasión tiene lugar en una o más de las siguientes zonas: testículos, próstata, epidídimo, vesículas seminales y/o glándulas bulbo-uretrales. Las lesiones en los machos, que casi siempre son unilaterales, comienzan con una hiperplasia que puede progresar hasta la formación de abscesos; la etapa final se caracteriza por la esclerosis y la atrofia. En varias articulaciones se puede presentar artritis y a veces espondilitis (OIE, 2008).

Como signos de la enfermedad en las cerdas, destacan el aborto en cualquier fase de gestación y el nacimiento de lechones muertos o débiles. En los jabalíes, el signo más destacado es la orquitis y pueden estar afectados los órganos sexuales secundarios. La *Brucella suis* puede estar presente en el semen, algunas veces no ocasiona ningún síntoma. La transmisión durante la monta es más común que en el caso de la brucelosis en los rumiantes. En ambos sexos, pueden verse afectados los huesos y especialmente las articulaciones y las vainas de los tendones, lo que causa cojera y, a veces, parálisis (OIE, 2004).

2.6. Brucelosis en humanos

La brucelosis, también llamada fiebre malta o fiebre ondulante, es una enfermedad bacteriana infecciosa que ataca a varias especies de mamíferos, dentro de los cuales se encuentra el hombre, causando la brucelosis humana. En el ser humano los agentes más frecuentes son *Brucella mellitensis* en un 98% y *Brucella abortus* en un 2%. Se menciona que la bacteria en los animales también además de la enfermedad, se presenta distinta sintomatología, lo que depende del huésped y la especie de *Brucella* en cuestión (García, 2014).

Las vías de contagio son: mucosas, heridas en la piel y la vía digestiva. La bacteria puede incluso entrar por las vías respiratorias mediante aerosoles. Muchas infecciones provienen de la manipulación de animales contaminados, por ingesta de leche o de sus productos no pasteurizados y por carnes poco cocidas. En países desarrollados es una enfermedad típicamente ocupacional donde las personas más

expuestas son veterinarios, peones de campo y trabajadores de la industria de la carne (DGE, 2012).

El período de incubación habitual varía entre 1 y 3-4 y 1-8 semanas, en su presentación clínica en forma aguda y sub-aguda. Como infección sistémica, se describe un amplio espectro de síntomas clínicos, usualmente con fiebre ondulante, sudoración nocturna, escalofríos, cefalea, anorexia, artralgias y malestar general. También se pueden registrar diversas complicaciones, entre ellas se menciona la neurobrucelosis como encefalitis, meningitis, meningo-encefalitis, neuropatía periférica, radiculopatía y alteraciones en el comportamiento, además espondilitis, uveítis, artritis, orquitis y prostatitis (Martínez, 2013).

2.7. Mecanismos de respuesta inmunitaria en la brucelosis

La bacteria *Brucella* es un cocobacilo Gram Negativo, sus antígenos son el lipopolisacárido (LPS) que induce la síntesis de anticuerpos aglutinantes y las proteínas que estimulan la inmunidad celular (Riley y Robertson, 1984).

2.7.1. Respuesta inmune innata

Las cepas de *Brucella abortus* rugosas no poseen LPS y las lisas poseen LPS y son fagocitadas solo si son opsonizadas por el complemento o por anticuerpos específicos (Harmon et al., 1989). Una vez que la bacteria es fagocitada se forma el fagolisosoma. Aunque el fagolisosoma puede ser inhibido por cepas virulentas de *Brucella abortus*. Las cepas de brucella opsonizadas inducen la liberación de

radicales de oxígeno en macrófagos procedentes de bovinos resistentes a la infección de *Brucella abortus* (Harmon et al., 1985).

Las células fagocíticas como el neutrófilo poseen enzimas hidrolíticas y haluros reactivos. Los neutrófilos utilizan los componentes de los gránulos para destruir los patógenos extraños al organismo. Aunque la desgranulación de estas células puede ser inhibida por *Brucella abortus* (Canning et al., 1985). Además algunos componentes de la membrana externa de la *Brucella spp*, como el lípido A del LPS tiene un papel relevante en la resistencia a los péptidos bactericidas. Por ello, el LPS es considerado como un factor de virulencia y actúa como una barrera protectora durante la actividad fagocítica de los neutrófilos.

La bacteria sobrevive en las células fagocíticas y no fagocíticas debido a la expresión de proteasas como es la enzima superóxido dismutasa Cu-Zn (SOD) y la proteasa de respuesta a temperaturas altas (Elzer et al., 1996; Tatum et al., 1992).

2.7.2. Inmunidad Humoral

El LPS induce la síntesis de las inmunoglobulinas IgM e IgG, post-infección natural o por la vacunación con cepa 19, estas inmunoglobulinas opsonizan las cepas patógenas, aunque nuevas células fagocíticas pueden ser invadidas, potenciando la infección y favoreciendo el establecimiento de la enfermedad (Hoffmann y Houle, 1983).

2.7.3. Inmunidad Celular

Como la bacteria se replica a nivel intracelular, por ello se activa la respuesta inmunitaria mediada por células con la finalidad de eliminar al patógeno o bien protegerlo. Las células que participan son los linfocitos T efectores CD+4 y CD+8, así como las moléculas clase I y clase II del Complejo Principal de Histocompatibilidad (Oliveira y Splitter, 1996).

2.7.4. Citoquinas

Las citoquinas proinflamatorias en respuesta a los antígenos de *Brucella* es la IL-12. La síntesis de IL-12 durante la infección de *Brucella abortus* es de vital importancia para activar las células Th1 productoras de interferón gamma (INF λ), y de esta manera promover la inducción de la resistencia celular adquirida (Zhan y Cheers, 1995).

El INF λ participa en la resistencia durante la infección de *Brucella abortus*. La *Brucella abortus* induce la secreción de INF λ en las células TCD+4 y CD+8. También el INF λ promueve la secreción de anticuerpos IG3 o IG2a contra el LPS de la cepa lisa de *Brucella*. Otra citoquina proinflamatoria es el factor de necrosis tumoral (TNF α), esta proteína es sintetizada durante la fase temprana de la infección intracelular, también participa en la resistencia a la *Brucella abortus* (Zhan y Cheers, 1995).

2.7.5. Especies lisas y rugosas de *Brucella*

Las especies de *Brucella* pueden ser clasificadas como “lisas” (smooth, S) o “rugosas” (rough, R) de acuerdo al aspecto de las colonias en medio sólido. El aspecto diferente de estas colonias reside en el tipo de LPS expresado en mayor proporción en superficie: LPS-S y LPS-R, respectivamente. El LPS-S consta de una parte glicolípídica (lípidos A), que se inserta en la membrana externa y otra polisacáridica expuesta hacia el exterior. Esta última se divide en dos secciones: el núcleo o “core”, más interno y la cadena O (polisacárido O: PSO). Esta cadena es un homopolímero lineal de perosamina que se encuentra ausente en el LPS-R de las especies rugosas (*B. ovis* y *B. canis*; Estein, 2006).

El PSO es el antígeno (Ag) inmunodominante de superficie, capaz de inducir una respuesta serológica en la mayoría de los animales en contacto con especies lisas de *Brucella* (*B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*); además es la estructura antigénica más expuesta y blanco de anticuerpos (Ac) protectores. Por otro lado, el PSO posee epítopes compartidos con otras especies bacterianas como *Yersinia enterocolitica* O:9, *Vibrio cholerae*, *Salmonella landau*, *Escherichia coli* O:157 H7 responsables de reactividad cruzada en las pruebas serológicas que se basan en la detección de Ac hacia este Ag (Estein, 2006).

2.8. Pruebas oficiales en el diagnóstico de la brucelosis

La Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales (SAGARPA, 1999), establece como pruebas oficiales las siguientes técnicas de laboratorio:

2.8.1. Prueba de tarjeta o rosa de bengala

Es un procedimiento cualitativo, rápido, de aglutinación macroscópica que se efectúa en una sola dilución y que detecta principalmente anticuerpos IgG1 y en menor grado IgM.

Detección de anticuerpos contra cepas lisas de *Brucella* (*Brucella abortus*, *Brucella melitensis* y *Brucella suis*) en sueros de animales sospechosos.

Esta prueba podrá ser realizada únicamente como prueba tamiz en bovinos, caprinos y porcinos.

Sirve como prueba tamiz por su alta sensibilidad y permite reducir el número de pruebas diagnósticas necesarias para controlar y/o erradicar la brucelosis en un rebaño o hato. Se fundamenta en que las IgG1 específicas contra *brucella* todavía actúan a un pH de 3.8, lo que determina la especificidad de la prueba.

2.8.2. Prueba de precipitación con rivanol

Detectar anticuerpos específicos contra cepas lisas de *Brucella* (*Brucella abortus*, *Brucella melitensis* y *Brucella suis*) en sueros de animales sospechosos, por la acción química del rivanol sobre las IgM y otras inmunoglobulinas del suero.

2.8.2.1. Campo de aplicación

Para efectos de campaña, se recomienda su realización en sueros de bovinos, que previamente resultaron positivos a la prueba de tarjeta.

Es una prueba serológica complementaria cuantitativa, altamente específica, ya que se basa en la precipitación selectiva de las IgM en el suero por el reactivo de rivanol.

2.8.3. Prueba de fijación de complemento

Determinar títulos de anticuerpos fijadores del complemento contra cepas lisas de *Brucella spp* presentes en el suero.

Esta prueba sirve como prueba confirmatoria en sueros de bovinos, caprinos, ovinos u otras especies que determine la SAGARPA.

La prueba de fijación de complemento ha sido ampliamente utilizada para el diagnóstico confirmatorio de la Brucelosis en las diferentes especies animales, debido a su gran sensibilidad y especificidad. Es capaz de detectar el isotipo IgG1; por esta razón resulta más precisa comparativamente con otras técnicas serológicas

y el diagnóstico bacteriológico. Se considera determinante en el diagnóstico confirmatorio de los sueros positivos a la prueba de tarjeta con antígeno teñido con rosa de bengala.

Es una prueba serológica rápida y sensible. Se basa en la activación del complemento por la vía clásica, en donde es necesaria la presencia de una unión antígeno anticuerpo para iniciar la reacción (fase invisible). Cuando existen anticuerpos contra *Brucella*, se da la reacción antígeno anticuerpo y el complemento se une a esta reacción (Ag- Ac- C'), siendo incapaz de unirse al sistema hemolítico, que es un segundo sistema antígeno anticuerpo (fase visible), observándose una sedimentación de los glóbulos rojos con anticuerpos o hemolisina. En ausencia de anticuerpos contra *Brucella* en el primer sistema durante la fase invisible, el complemento queda libre, uniéndose al segundo sistema antígeno anticuerpo o sistema hemolítico, observándose una hemólisis.

2.8.4. Fluorescencia Polarizada

La prueba se basa en la rotación aleatoria de las moléculas en solución, siendo el tamaño molecular el principal factor que influencia la velocidad, con relación de proporcionalidad inversa. Al añadir el suero problema para detectar la presencia de anticuerpos y agregar un antígeno de pequeño peso molecular marcado con un fluorocromo, es posible determinar el tiempo de rotación. La unión con el antígeno marcado provoca un descenso en su velocidad rotacional, que puede ser medida ya que una molécula grande emite más luz en un único plano (más polarizada) que una pequeña que gira más

deprisa y emite luz menos polarizada (Sánchez et al., 2010). Esta prueba cuantitativa se lleva a cabo mediante la tecnología de Fluorescencia Polarizada que determina la presencia de anticuerpos contra *Brucella abortus* en sueros de bovinos. La presencia de anticuerpos es indicativo de una infección previa con *Brucella abortus* o de una vacunación con cepa lisa, como es la Cepa 19. Los bovinos vacunados con cepa rugosa como la RB 51 no reaccionan positivo en la prueba.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar del área de estudio

Este estudio se realizó en el Laboratorio de Análisis Clínicos y Patología Veterinaria de la Laguna S.C, ubicado en la Av. Trujano 1024 sur en la ciudad de Gómez Palacio, Dgo.

3.2. Metodología

3.2.1. Muestreo sanguíneo

Se tomaron 87 muestras de sangre de bovinos de establos localizados en la Comarca Lagunera. Se analizaron mediante la pruebas de tarjeta, rivanol, fijación de complemento y fluorescencia polarizada.

3.2.2. Material

- Contenedor de objetos punzantes o guardián
- Bolsa para desechos biológicos (roja)
- Marcador indeleble
- Formato de recolección de muestra.
- Guantes desechables
- Agujas de seguridad para extracción de sangre venosa por sistema de vacío, calibre 20 G.
- Fundas o camisas de agujas de punción intravenosa-vacutainer.
- Tubos de recolección de sangre estériles sin anticoagulante (tapa roja).

3.2.3. Toma de muestra de la vena coccígea

- 1) Rotular o identificar el tubo.
- 2) Colocarse los guantes
- 3) Levantar la cola del animal con suavidad hasta casi colocarla casi en posición vertical, sujetándola en el tercio medio.
- 4) Retirar los residuos de materia fecal y limpiar la zona con papel.
- 5) Con la mano libre localizar por palpación la vena en la línea media, justo caudal de la inserción de los pliegues de la piel de la cola a nivel del espacio entre las vértebras coccígeas (Co) 6 - 7.
- 6) Empatar la aguja en la funda o camisa.
- 7) Encajar el tubo en la funda o camisa sin perforarlo.
- 8) Insertar la aguja craneal a la protuberancia ósea del proceso laminar en la línea media a una profundidad de 8- 12 milímetros en ángulo recto, hasta que la sangre empiece a brotar. Si no es posible obtener la muestra en este sitio, intentar entre Co 5-6.
- 9) Estabilizar la funda y la aguja con la mano, colocar el pulgar de la otra mano en la parte inferior del tubo y los dedos índice y medio en las aletas de la funda. Presionando con el pulgar y el dedo índice el uno contra el otro, se forzarán al tapón de goma, introduciendo la aguja en el tubo. La sangre fluirá dentro del mismo.
- 10) Mantener la funda estable, hasta consumir todo el vacío y retirar el tubo.

- 11) Retirar la aguja y ejercer presión sobre la zona de punción con gasa por unos segundos.
- 12) Desechar las agujas en el guardián, y el resto de materiales contaminados en la bolsa roja.
- 13) Quitarse los guantes.

3.3. Transporte de sueros sanguíneos

Las muestras sanguíneas se enviaron al laboratorio utilizando el procedimiento más rápido disponible. Si las muestras pueden llegar al laboratorio antes de 48 horas, se deben enviar refrigeradas. Si se utiliza hielo seco, se deben seguir normas adicionales de empaquetado (Zambrano et al., 2012).

3.4. Prueba de Tarjeta

El antígeno y las muestras se dejan a temperatura ambiente (18 – 26°C) antes de comenzar a trabajar.

Las muestras fueron centrifugadas para separar el suero del plasma a una velocidad de 3000 rpm durante un tiempo de 4 minutos. Cuando ya son centrifugadas son llevadas al área de virología para ser trabajadas. La prueba consta de tomar 30 µl de suero y 30 µl de antígeno y son colocadas en una placa de vidrio cuadrada después se agitan el suero y el antígeno con un palillo de dientes y se mezcla en forma de círculos y se deja reposando por 4 minutos, al concluir los 4 minutos se

revisan las muestra mezclándolas y con ayuda del aglutinoscopio se observa si las muestras han aglutinado. Si alguna de las muestras presenta aglutinación se considera positiva y si no aglutina se considera negativa.

Si alguna de las muestras sale positiva se le hace una segunda prueba para reconfirmar si es positiva esta es la prueba de rivanol.

3.5. Prueba de Rivanol

Los reactivos y las muestras se dejan a temperatura ambiente (18 – 26°C) antes de comenzar a trabajar.

La prueba consta en tomar 400 µl de suero y 400 µl de rivanol y depositarla en un tubo y agitar fuerte y dejar reposar por 20 minutos, cuando este tiempo acaba se centrifuga a una velocidad de 2000 rpm por un tiempo de 5 minutos. A continuación se hacen las siguientes diluciones:

- 80 µl del sobrenadante de suero y rivanol con 30 µl del antígeno.
- 40 µl del sobrenadante de suero y rivanol con 30 µl del antígeno.
- 20 µl del sobrenadante de suero y rivanol con 30 µl del antígeno.
- 10 µl del sobrenadante de suero y rivanol con 30 µl del antígeno.
- 5 µl del sobrenadante de suero y rivanol con 30 µl del antígeno.

Después se agitan el sobre nadante y el antígeno y se deja reposar por 12 minutos, a los 6 minutos hay que checar mezclando en forma de ochos, y se checa la aglutinación en el aglutinoscopio.

El resultado que se toma es hasta donde haya llegado de la aglutinación en las diferentes diluciones.

Se lavan la placa de vidrio con jabón, se enjuaga y se seca con papel.

3.6. Fijación de Complemento

Materiales:

- Material de vidrio de volúmenes varios.
- Pipetas de: 1 ml, 2 ml, 5 ml y 10 ml.
- Gradillas.
- Parafilm para cubrir placas.
- Puntas de pipetas (Tips).
- Tubos de centrifuga cónicos.
- Tubos de Khan.
- Placas de polipropileno de 96 pocillos con fondo en U.

Equipos:

- Estufa $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

- Termo de nitrógeno líquido o freezer (- 70°C ± 10°C).
- Baño termostático 60-63°C.
- Agitador de placas.
- Espectrofotómetro (540nm).
- Micropipetas automáticas monocanales y multicanales de rango 10 µl a 200µl.
- Termómetros certificados.
- Potenciómetro.

Balanza

Reactivos:

Manual de diagnóstico *Brucella ovis*

- Suspensión de glóbulos rojos 2% (GR 2%).
- Hemolisina producida en conejo (H).
- Complemento de cobayo (C).
- Antígeno de *Brucella ovis* (Cepa REO 198) (Ag).

Sueros:

- Suero control positivo.
- Suero control negativo.
- Sueros problemas a analizar.

Soluciones:

- Tampón veronal calcio magnesio 5X (TV 5X).
- Tampón veronal calcio magnesio 1X, pH 7,3-7,4. (TV 1X).

Ejecucion de la prueba (Microtécnica):

Utilizar microplacas de 96 pocillos fondo en U. Presentar la microplaca de manera que las letras (A-H) indiquen columnas (diluciones del suero) y los números (1-12) indiquen las filas (sueros a analizar). De esta manera, en cada placa se incluyen 12 muestras de suero para análisis y a cada muestra se le realizan 8 diluciones en base 2 (1:2 a 1:256).

El procedimiento se desarrolla en caliente (incubación en estufa a $37 \pm 2^\circ\text{C}$) y utiliza los siguientes reactivos en volúmenes de 25 l:

- a) Tampón Veronal 1X.
- b) Sueros inactivados a $60 - 63^\circ\text{C}$
- c) Solución de complemento de cobayo en TV 1X que contenga 2 UC/ml.
- d) Solución de antígeno en TV 1X a la dilución de trabajo.
- e) Sistema hemolítico obtenido por la mezcla de volúmenes iguales de una solución de hemolisina en TV 1X que contenga 2 UH/ml y de una suspensión de eritrocitos de carnero en TV 1X al 2%.

Inactivación de los sueros

Las muestras de suero se inactivan en baño termostático para eliminar el complemento natural contenido en las mismas.

La temperatura del baño se controlará mediante la introducción de un termómetro certificado durante todo el tiempo de exposición de las muestras al agua.

Los sueros se inactivan por 30 minutos en baño termostático a 60°C – 63°C (en caso de que los sueros sean anticomplementarios, se recomienda realizar otro ciclo de inactivación de 30 minutos).

La inactivación de las muestras podrá realizarse un día antes del análisis. En este caso, una vez retiradas del baño termostático se dejarán a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos para luego conservar en heladera. Si el análisis se realizaría después de las 24 hs, las muestras ya inactivadas se conservaran a (-20 ±5° C.)

Controles utilizados

Sueros controles:

Control positivo

- Prediluir el suero control positivo 1/12,5 con TV 1X, inactivar, alicuotar y conservar a (-20 ± 5 ° C).
- Dispensar 25 µl/pocillo de TV 1X en la fila 1 de la placa control desde 1G hasta la 1A.
- Dispensar en el pocillo H1, 50 µl del suero control positivo diluído previamente 1/12,5 con TV 1X, tomar 205 µl de suero del pocillo H1 y pasarlo al pocillo G1,

homogeneizar bien los dos componentes, luego pasar 25 µl al siguiente pocillo F1, y repetir la misma secuencia hasta el pocillo A1.

Control negativo

Se realiza una dilución en base 1:2 de la siguiente manera:

- Dispensar 25 µl/pocillo de TV 1X en la fila 2 de la placa control desde 2H hasta la 2A,

- Dispensar en el pocillo H2, 25µl del suero control negativo, homogeneizar bien, tomar 25 µl del pocillo H2 y pasarlo al pocillo G2, homogeneizar bien los dos componentes, luego pasar 25 µl al siguiente pocillo F2, y repetir la misma secuencia hasta el pocillo A2.

- Control de la ausencia de poder anticomplementario (PA) del antígeno

Dispensar por duplicado (H3 y G3) en la microplaca de los controles

- 25µl/ pocillo de la solución de antígeno

- 25µl/pocillo de TV 1X

- 25µl/pocillo de C

Controles del sistema hemolítico

Sin complemento: Dispensar 75µl de TV 1X por duplicado (H4 y G4) en la placa de controles.

Con complemento: Se dispensa en H5

- 50µl/pocillo de TV 1X

- 25µl/pocillo de C

3.6.1. Dilución de las muestras de sueros problemas

En otra placa:

- Dispensar en cada pocillo 25 µl de TV 1X, de acuerdo a la cantidad de sueros a procesar.

- Dispensar 25 µl de suero en el pocillo H1, homogeneizar bien los dos componentes con pipetas monocanal o multicanal, luego pasar 25µl del pocillo H1 al G1, homogeneizar y pasar 25 µl al pocillo F1, luego repetir la misma secuencia hasta el pocillo A1.

-.Las diluciones se realizarán con pipetas monocanal o multicanal. La homogenización de los dos componentes de cada dilución se mezclan mediante el pipeteo por cinco veces consecutivas como mínimo.

3.6.2. Preparación de la solución de antígeno y complemento y su distribución en la microplaca de los sueros controles positivo y negativo y en los sueros a analizar.

Se preparan las soluciones de C y Ag según la dilución de trabajo establecida como óptima. Una vez diluidos los sueros con la TV 1X, dispensar la solución de antígeno a razón de 25µl /pocillo, en todos los pocillos excepto en la columna H de la dilución 1:2 que actuarán como controles de poder anticomplementario (PA) de cada suero.

A continuación dispensar 25 μ l/pocillo de la solución de C en todos los pocillos de la microplaca.

Primera incubación en caliente

- Cubrir y agitar las microplacas en agitador de placas durante 2 – 4 minutos.
- Incubar las microplacas en estufa a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos.

3.6.3. Agregado del sistema hemolítico

- Finalizada la primera incubación, dispensar el sistema hemolítico a razón de 25 μ l en todos los pocillos de las placas.

3.6.4. Segunda incubación en caliente (igual a la anterior)

Centrifugación/reposo de la microplaca

- Finalizada la segunda incubación, centrifugar las microplacas a 2000 rpm durante 5 minutos o bien dejar en reposo en heladera durante una hora antes de su lectura.

3.6.5. Cálculos y expresión de los resultados

El grado de fijación del complemento se manifiesta por la presencia o ausencia de hemólisis del sistema hemolítico. Se expresa en forma de UIFC (unidades internacionales fijadoras del complemento) según el título o dilución de la muestra (1:4,1:8, etc.) seguido de 1, 2, 3 o 4 cruces según el grado de fijación de

complemento en dicha dilución. El título menor que se cuantifica es 1:4 + (16,6 UIFC) y el rango de trabajo está comprendido entre 1:4 + y 1:256 +++++ (16,6 a 1702,7 UIFC).

El poder anticomplementario de los sueros se controla en la columna H, dilución 1:2. La presencia de al menos un 25% de sedimento de eritrocitos (+) en la fila H (dilución 1:2) indica que el suero problema puede tener poder anticomplementario.

En tal caso se informa el resultado "AC", y se solicitará una nueva extracción de suero para repetición del ensayo. El resultado de la reacción será "positivo" o "negativo". En el primer caso la reacción positiva se cuantificará mediante la determinación del título y su grado de hemólisis o fijación del complemento.

3.6.6. Reacción positiva

- Sedimentación en grado variable de los eritrocitos en el fondo del pocillo.
- El sobrenadante estará afectado por un cierto tinte rojizo en función de la hemólisis que se haya producido.

3.6.7. Interpretación de los resultados

Existe un sistema de unidades basado en el Estándar Internacional para el Suero anti-*Brucella ovis* (Estándar Internacional 1985). Este suero contiene 1000 UIFC/ml. Si este suero se analiza con un método determinado y da, por ejemplo, un título de 100, entonces el factor para un suero desconocido analizado mediante ese método

se puede hallar a partir de la fórmula: $1.000/100 \times \text{título del suero problema} =$ número de UIFC (unidades internacionales de FC) de anticuerpo en el suero problema por ml. Los resultados deben expresarse siempre en UIFC, calculados con relación a aquellos obtenidos en una titulación en paralelo con un suero patrón nacional, que a su vez ha sido estandarizado con el suero Estándar Internacional. Se considerara la muestra positiva cualquier valor ≥ 50 UIFC/ml (1/8 ++++).

3.7. Florescencia Polarizada

Los reactivos y las muestras se dejan a temperatura ambiente (18 – 26°C) antes de comenzar a trabajar.

Preparación para la solución para diluir.

La solución para diluir 25x deberá alcanzar una temperatura de 16-26°C y agitarse para asegurar la dilución de las sales que se hayan precipitado.

Mezclar 1 parte de solución para diluir 25x en 24 partes de agua destilada, la solución es estable durante una semana.

Procedimiento:

1. En una tira de la placa de borosilicato de 10 x 75 mm dispensar 180 µl de solución para diluir en cada pozo según las muestras que se le van a trabajar.
2. Dispensar 20 µl de control negativo (3 pozos)
3. Dispensar 20 µl de control positivo.

4. Dispensar 20 µl de muestra en los pozos restantes.

1. –

2. –

3. –

4. +

5. M

6. M

7. M

8. M

5. Llevar la muestra al aparato para su lectura.

Encender el Sentry 2000SI con el botón situado en la parte trasera del aparato. El botón de enfrente solo indica que el aparato esta encendido, no mover. Prender la computadora e ingresar el acceso directo Excel Sheet For Running FPA Blank. Aparecerá una hoja de Excel donde se va a trabajar.

Seleccionar Sentry, aparecerán varias opciones:

Test Protocol System About

Escoger la opción de System y aparecerá un recuadro grande, en donde vamos a seleccionar Connect.

Posteriormente introducirla en el trazador.

Presionar carrier out para sacar el riel.

Introducir un microtubo obscuro.

Seleccionar prime para llenar la manguera de trazador.

Seleccionar nuevamente prime para purgar la manguera y al mismo tiempo llenarla de trazador.

Presionamos carrier out para mover el riel.

Tomamos el vial y regresamos el trazador a su frasco.

Volvemos a poner el vial en el riel y presionamos carrier in para meter el riel.

Hacer esto en 2 ocasiones para cerciorarnos que no quede aire en la manguera; al terminar presionar ok.

En la hoja de trabajo seleccionamos la primera columna (3 control (-), 1 control (+), 4 muestras).

NOTA: cuando la hoja de trabajo está llena, vaciar las cuatro primeras columnas, seleccionando la celda y apretando la tecla delet.

Seleccionar Sentry.

Elegimos test y checamos que el protocolo sea el correcto (incubación de 10 segundos).

Presionar Run y saldrá el riel, colocamos la tira con las muestras en el riel y nos aparece una leyenda, donde dice, que se asegure que si esta insertara la tira, checamos que este correctamente insertada y presionamos OK.

Se introduce el riel y comienza a realizar las lecturas.

NOTA: nuestros controles negativos deberán tener un valor entre 70-95 aproximadamente, si estos valores nos dan un poco más altos, o bajos, podemos ajustar con nuestro factor.

El Factor se modifica por la temperatura, humedad, ambiente o altitud de la ciudad que se realice la prueba.

Ejemplo:

Resultados obtenidos

	mP	Factor
NC	69.46	
NC	69.68	1.02
NC	70.81	

Resultados con el factor corregido

	mP	Factor
NC	74.36	
NC	74.58	1.01
NC	75.77	

Al terminar de correr las muestras, introducir un vial en el riel y recuperar el trazador que quedo en la manguera de la siguiente forma:

Sacar la manguera del trazador.

Elegimos Prime para recuperar el trazador y regresarlo al frasco, repetir esta acción dos veces.

Limpieza del aparato

Introducir la manguera en agua destilada.

Poner un vial.

Introducir la bandeja de desechos en el riel de muestras.

Seleccionar Prime para llenar la manguera de agua destilada.

Elegimos full, para vaciar la manguera.

Repetir este pasó en 2 ocasiones.

Sacar la manguera del agua y dejarla al aire.

Realizar el mismo procedimiento del agua pero con aire, para secar la manguera.

Cuando terminemos la limpieza se saca el vial, la bandeja de desecho y apagamos el aparato.

Por último la manguera de absorción deberá sumergirse en agua destilada hasta que se utilice de nuevo el aparato.

3.8. Análisis de datos

Los datos se analizaron tomando como base el siguiente cuadro de contingencia (Tabla 1).

Tabla 1. Cuadro de contingencia de sensibilidad y especificidad. La sensibilidad es la capacidad de la prueba para detectar la enfermedad en animales enfermos. La especificidad indica la capacidad de la prueba para detectar la ausencia de la enfermedad en sujetos sanos.

Tipos de diagnóstico	Enfermedad	
	Ausente	Presente
Prueba diagnóstica		
Negativa	Verdadero negativo (diagnóstico negativo, enfermedad ausente)	Falso negativo (diagnóstico negativo, enfermedad presente)
Positiva	Falso positivo (diagnóstico positivo, enfermedad ausente)	Verdadero positivo (diagnóstico positivo, enfermedad presente)

Prueba de tarjeta: 72 positivos y 15 negativos

$$(a) \text{ Sensibilidad} = \frac{VP}{(VP+FN)} \times 100$$

$$\text{Sensibilidad} = \frac{72}{(72+15)} = \frac{72}{87} = 0.82 \times 100 = 83 \%$$

$$\text{(b) Especificidad} = \frac{\text{VN}}{(\text{VN} + \text{FP})} \times 100$$

$$\text{Especificidad} = \frac{15}{(15+72)} = \frac{15}{87} = 0.17 \times 100 = 17 \%$$

Prueba de rivanol: 72 positivos y 15 negativos

Se desarrollan las fórmulas a y b

$$\text{Sensibilidad} = \frac{72}{(72+15)} = \frac{72}{87} = 0.82 \times 100 = 83 \%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{15}{(15+72)} = \frac{15}{87} = 0.17 \times 100 = 17 \%$$

Prueba de fluorescencia polarizada: 85 positivos y 2 negativos

Se desarrollaron las fórmulas a y b

$$\text{Sensibilidad} = \frac{85}{(85 + 2)} = \frac{85}{87} = 0.97 \times 100 = 98 \%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{2}{(2+85)} = \frac{2}{87} = 0.02 \times 100 = 2 \%$$

Prueba de fijación de complemento: 20 positivos y 67 negativos

$$\text{Sensibilidad} = \frac{20}{(20 + 67)} = \frac{20}{87} = 0.22 \times 100 = 22$$

$$\text{Especificidad} = \frac{67}{(67+20)} = \frac{67}{87} = 0.77 \times 100 = 77$$

4. RESULTADOS

Los resultados de las pruebas de tarjeta, rivanol, fijación de complemento y fluorescencia polarizada se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2 Diagnóstico de Brucelosis mediante las pruebas Florescencia Polarizada, Tarjeta o Rosa de Bengala, Rivanol y Fijación de Complemento, realizada en sueros de bovinos en hatos de la Comarca Lagunera.

	Florescencia Polarizada	Tarjeta	Rivanol	Fijación de complemento
Sensibilidad	85 (+) 98%	72 (+) 83%	72 (+) 83%	20 (+) 22%
Especificidad	2 (-) 2%	15 (-) 17%	15 (-) 17%	67 (-) 77%

5. DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio indican valor alto en la sensibilidad y bajo en la especificidad en el diagnóstico de brucelosis bovina por la prueba de fluorescencia polarizada comparada con las pruebas tradicionales de tarjeta o rosa de bengala, rivanol y fijación de complemento. El resultado del presente estudio muestra concordancia con la hipótesis planteada. Además los actuales resultados son similares a estudios previos realizado en sueros de cabras donde se evaluó el desempeño de la pruebas aceptadas por la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) comparada con la prueba de fluorescencia polarizada (Pfeiffer et al., 2009), en dicho estudio el desempeño de la fluorescencia polarizada la sensibilidad fue alta con 88% y en el actual estudio con sueros de bovinos fue 98%.

En otro estudio donde el objetivo fue determinar el efecto de la vacunación contra brucelosis en la respuesta humoral en becerras, los resultados no difirieron significativamente al comparar la prueba de fluorescencia polarizada con la prueba de Mercapto Etanol, Antígeno buferado, Wright o sero-aglutinación en tubo; sin embargo, la prueba de fluorescencia polarizada detectó mayor número de animales negativos (Meglia et al., 2011).

En un estudio realizado en camélidos, se analizaron 336 muestras de sueros sanguíneos (315 de llamas y 21 de alpacas) mediante fluorescencia polarizada, rosa de bengala, aglutinación lenta en tubo, fijación de complemento y ELISA de Competencia. Los resultados fueron negativos a todas a las pruebas rosa de bengala, aglutinación lenta en tubo, fijación de complemento, y dos muestras resultaron positivos con la prueba de fluorescencia polarizada con 98.7 y 99.11 mP

cada una, mientras que con la prueba de ELISA de Competencia también 2 muestras resultaron positivo (%I), con 32 cada uno (Rojas et al., 2004).

Con la finalidad de determinar la efectividad de la prueba de Rosa de Bengala y la fluorescencia polarizada en ganado bovino se muestrearon 319 bovinos, los resultados mostraron efectividad entre la prueba de Rosa de Bengala y la fluorescencia polarizada. Sin embargo, mediante un modelo de regresión logística se demostró que la fluorescencia polarizada es una prueba confiable, si se tiene información en relación al sexo, edad, abortos para seleccionar un adecuado patrón de corte (Muma et al., 2009).

Asimismo los resultados del presente estudio muestran concordancia con un estudio realizado en bovinos, donde la prueba de fluorescencia polarizada mostró valores sensibilidad y especificidad similares en los reportados a en el presente estudio (99 y 97%, respectivamente; Dajer et al., 1999).

6. CONCLUSIÓN

Se concluye que la prueba de fluorescencia polarizada es confiable por los valores de sensibilidad y especificidad comparadas con las pruebas tradicionales en el diagnóstico de la brucelosis en bovinos.

7. LITERATURA CITADA

- Aguilar-Romero, F., Cantú-Covarrubias, A., Díaz-Aparicio, E., Favila-Humara, L.C., Herrera-López, E., Morales Álvarez, J.F., Palomares-Resendiz, E.G., Santillán Flores, M.A. 2011. Prevención de brucelosis en rumiantes. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). México D.F.
- Canning, P.C., Roth, J.A., Tabatabai, L.B., Deyoe, B.L. 1985. Isolation of components of *Brucella abortus* responsible for inhibition of function in bovine neutrophils. *The Journal of Infectious Diseases*.152: 913-921.
- Dajer, A., Luna-Martínez, E., Zapata, D., Villegas, S., Gutierrez, E., Peña, G., Gurría, F., Nielsen, K., Gall, D. 1999. Evaluation of a fluorescence – polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis in México. *Preventive Veterinary Medicine*. 67-73.
- Dájer-Abimerhi, A., Gutiérrez-Ruiz, E. J., Zapata-Villalobos, D. M., Sierra-Lira, E. M., Cámara-Gamboa, E. I. 2003. Evaluación de una prueba de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de competencia (ELISA-C) para el diagnóstico serológico de la brucelosis bovina. *Revista Biomédica*. Vol. 14. 23-28.
- Díaz-Aparicio, E. 2013. Epidemiología de la brucelosis causada por *Brucella melitensis*, *Brucella suis* y *Brucella abortus* en animales domésticos. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*. 43 - 51.

Dirección General de Epidemiología (DGE) 2012. Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de la Brucelosis.

Disponible en:

http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/vig_epid_manuales/03_2012_Manual_Brucelosis_vFinal_13nov12.pdf. Fecha de acceso 29 de octubre 2016

Elzer, P.H., Phillips, R.W., Robertson, G.T., Roop, R.M. 1996. The Ht RA response protease contributes to resistance of *Brucella abortus* to killing by murine phagocytes. *Infection and Immunity*. 64: 4838-4841.

Estein., S.M. 2006. Brucelosis: Inmunidad y vacunación. *Revista Electrónica de Veterinaria*. Vol. VII, Nº 05.

García-Juárez, G., Ramírez-Bribiesca, J. E., Hernández-Vázquez, M., Hernández-Calva, L. M., Díaz-Aparicio, E., Orozco-Bolaños, H. 2014. Análisis de riesgos de la brucelosis en el estado de Tlaxcala. *Salud pública de México*. 355-362.

Harmon, B.G., Adams, L.G. 1989. Frey M. Survival of rough and smooth strains of *Brucella abortus* in bovine mammary gland macrophages. *American Journal of Veterinary Research*. 146:1092-1097.

Harmon, B.G., Templeton, J.W., Crowford, R.P, Heck, F.C, Williams, J.D. 1985. Macrophage function and immune response of naturally resistant and susceptible cattle to *Brucella abortus*. *Genetic Control of host resistance to infection and malignancy. Genetic Control of host resistance to infection and malignancy*. 345-354.

Hoffmann, E.M., Houle J.J. 1983. Failure of *Brucella abortus* lipopolisaccharide (LPS) to activate the alternative pathway of complement. *Veterinary Immunology and Immunopathology*.5: 65-76.

Manual de animales terrestres. OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal). 2008. Brucelosis porcina. Capítulo 2.8.5. Disponible en http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.08.05.%20Brucelosis%20porcina.pdf. Fecha de acceso 28 de octubre 2016.

Manual de la OIE sobre animales terrestres (Organización Mundial de Sanidad Animal). 2004. Brucelosis caprina y ovina (no debida a *brucella ovis*). Capítulo 2.4.2. Disponible en http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.4.02_Brucelosis_caprina_y_ovina.pdf fecha de acceso 28 de octubre 2016.

Manual de la OIE sobre animales terrestres (Organización Mundial de Sanidad Animal).2004. Brucelosis porcina. Capítulo 2.6.2. Disponible en http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.6.02_Brucelosis_porcina.pdf fecha de acceso 28 de octubre del 2016.

Martínez, P. 2013. Brucelosis humana: situación epidemiológica en Chile, 2001-2010. *Revista chilena de infectología*. 653-659.

Megliá, G., Gastaldo, M., Álvarez-Rubianes, N., Oriani, S., Cerutti, D.,Dubarry, J., Cisterna C., Perea, J. 2011. Influencia de la edad de vacunación con la vacuna *B. abortus* S19 en la respuesta serológica inducida en terneras. In *Veterinary Science*.13;19-26.

Muma, J.B., Lund, A., Nielsen, K., Matope, G., Munyeme, M., Mwacalimba, K., Skjerve, E. 2009. Effectiveness of Rose Bengal test and fluorescence polarization assay in the diagnosis of *Brucella spp.* infections in free range cattle reared in endemic areas in Zambia. *Tropical Animal Health and Production*. 723-729.

Oliveira, S.C., Splitter, G.A. 1996. CD8+ type 1 CD44hiCD45Rblo T lymphocytes control intracellular *Brucella abortus* infection as demonstrated in major histocompatibility complex class I and class II deficient mice. *European Journal of Immunology*. 25:2551-57.

Ortiz-Losada, E. E., Silva-Cabrera, E., Izquierdo-Márquez, M. 2007. Normalización y evaluación del inmunoensayo ABICAP-BRU para el diagnóstico serológico de la Brucelosis Bovina. *Revista electrónica de Veterinaria*. 57-89.

Programa Nacional Pecuario, SAGARPA. Disponible en:

<http://www.gbcbiotech.com/bovinos/industria/Programa%20Nacional%20Pecuario%202007-2012%20-%20SAGARPA.pdf>. Fecha de acceso 5 de septiembre de 2016.

Ramírez-Pfeiffer, C., Gómez-Flores, R., Rodríguez-Padilla, C. 2009. Aplicación de la prueba de fluorescencia polarizada para la detección de brucelosis. *Ciencia UANL*, VOL. XII, Nuevo León México. 295-304.

Riley, L.K., Robertson, D.C. 1984. Ingestion and intracellular survival of *Brucella abortus* in human and bovine polymorphonuclear leukocytes. *Infection and Immunity*. 46:224-230.

- Rojas, X., Muñoz, S., Otto, B., Pérez, B., Nielsen, K. 2004. Utilización de los test de Fluorescencia Polarizada (FP) y Elisa de Competencia (C-Elisa) en el diagnóstico de brucelosis de camélidos. Archivos de Medicina Veterinaria. XXXVI, 59-64.
- Russo, A. M., Mancebo, O. A., Monzón, C. M., Gait, J. J., Casco, R. D., Torioni de Echaide, S.M. 2015. Epidemiología de la brucelosis caprina y ovina en la provincia de Formosa, Argentina. Revista Argentina de Microbiología. 147-153.
- Samartino, L., Schust, M., Piazza, E., Salustio, E., Conde, S. 2007. Diagnóstico de la brucelosis animal: Implementación de nuevas tecnologías. Animal Production Science. 20-23.
- Sánchez-Villalobos, A., Rodríguez-Vargas, M., Becerra-Ramírez, L., Cordero, R. 2010. Utilidad de las técnicas fluorescencia polarizada y del inmunoensayo enzimático de competencia para diagnóstico de brucelosis en caballos purasangre de carreras. Asociación Interciencia. 131-135.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 1999. Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995. Campaña Nacional contra la Brucelosis en los animales. Diario Oficial de la Federación, 22 febrero de 1999. México, D. F.
- Subdelegación de Ganadería, Delegación en la Región Lagunera, 2015. El Siglo de Torreón. 31 de diciembre de 2015.

- Tatum, F.M., Detilleux, P.G., Sacks, J.M., Halling, S.M. 1992. Construction of Cu-Zn superoxide dismutase deletion mutants of *Brucella abortus*: Analysis of survival in vitro in epithelial and phagocytic cells and in vivo in mice. *Infection and Immunity*.60:2863-2869.
- Tique V., González, M., Mattar, S. 2009. Seroprevalencia de *brucella abortus* en bovinos del departamento de Córdoba. *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.*12. 51- 59.
- Zambrano, J. L. 2012. Guía para la correcta toma de sangre en bovinos a partir de la vena coccígea y de la vena yugular externa. Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá Facultad de Veterinaria y Zootecnia Comité de Bioética.
- Zhan, Y., Cheers, CH. 1995. Endogenous interleukin-12 is involved in resistance to *Brucella abortus* infection. *Infection and Immunity*.63:1387-1390.