

Presencia de anticuerpos contra diferentes especies de *Brucella* en sementales ovinos jóvenes

Elba Dolores Núñez Torres*
Efrén Díaz Aparicio**
Francisco Velázquez Quezada*
Francisco Trigo Tavera***
Francisco Suárez Güemes**

Abstract

Distribution of ovine brucellosis, either caused by *B. ovis* or by smooth brucellas (*B. abortus* or *B. melitensis*) is unknown in Mexico. The objective of this study was to determine the presence of antibodies against *B. ovis* and smooth brucellas in young rams from eight different states of Mexico. Six-hundred and twenty-two rams' sera were studied. The animals were of different breeds: Suffolk, Black Belly, Hampshire and Pelibuey. The age of these animals varied from 6 to 11 months, and they originated from 39 different flocks. The double immunodiffusion test employing a saline extracted antigen was used for *B. ovis* diagnosis. Smooth brucella antibodies were evaluated with the card test, using two different antigen cellular concentrations (3% and 8%), and the complement fixation test. There were 15 (2.4%) positive sheep to *B. ovis* antigen using the immunodiffusion test, representing 20.5% of the total flock sampled. Regarding the smooth brucellas, there were only 5 seropositive sheep (0.8%) with an 8% cellular concentration antigen and 17 (2.7%) with a 3% cellular concentration antigen. There were also 3 seropositive sheep (0.48%) to the complement fixation test. Eleven (28.2%) seropositive flocks were found against smooth brucellas. Our results indicate that infections due to *B. ovis* and smooth brucella are present in significant percentages to be considered in national control- and eradication programs.

Key words: BRUCELLOSIS, OVINE, DIAGNOSIS, SEROLOGY, MEXICO.

Resumen

En México se desconoce la distribución de la brucelosis ovina causada tanto por *Brucella ovis* como por brucelas lisas (*B. abortus* y *B. melitensis*); en este sentido el objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de anticuerpos contra *B. ovis* y brucelas lisas, en sementales ovinos jóvenes, de ocho diferentes estados de la República mexicana. Se obtuvieron 622 sueros de ovinos machos, de las razas Suffolk, Blackbelly, Hampshire y Pelibuey, de entre seis y 11 meses de edad, pertenecientes a 39 diferentes rebaños. Para el diagnóstico de *B. ovis* se empleó la prueba de inmunodifusión doble en agar usando como antígeno un extracto salino. Las pruebas utilizadas para la detección de anticuerpos contra brucelas lisas fueron la de tarjeta, con dos diferentes concentraciones celulares del antígeno (3% y 8%) y la de fijación de complemento. Los reactores

Recibido el 11 de diciembre de 1996 y aceptado el 20 de marzo de 1997.

* Proyecto Brucelosis, CENID-Microbiología, INIFAP-SAGAR, Km 15.5, Carretera México Toluca, 05110, Cuajimalpa, D.F. México.

** Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 04510.

*** Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

Este trabajo fue parcialmente financiado por los proyectos PAPIIT- UNAM, IN 504695; INSERM -Francia "Norte Sur" y UNAM - TAMU "University Development Linkage Project".

positivos a la prueba de inmunodifusión fueron 15, que representaron 2.4%; hubo ocho rebaños con animales positivos, esto correspondió al 20.5%. Respecto de las brucelas lisas el número de reactores a la prueba de tarjeta al 8% de cc fue de 5 (0.8%), mientras que con antígeno al 3% de cc el número de reactores fue de 17 (2.7%). A la prueba de fijación del complemento presentaron reacción positiva 3 sueros (0.48%). Once rebaños tuvieron animales positivos a las pruebas con antígenos lisos de brucelas (28.2%). Los datos obtenidos en el presente estudio ponen de manifiesto que las infecciones causadas tanto por *B. ovis* como por brucelas lisas, se encuentran presentes en porcentajes que deben tomarse en consideración por los programas de control de la enfermedad

Palabras clave: BRUCELOSIS, OVINOS, DIAGNÓSTICO, SEROLOGÍA, MÉXICO.

La brucelosis es una enfermedad causada por las diferentes especies del género *Brucella*, éstas afectan a gran variedad de animales tanto domésticos como silvestres. La infección por brucelas lisas afecta principalmente a hembras adultas, se caracteriza por la producción de aborto, infertilidad y aumento en la mortalidad perinatal; los machos son más resistentes y cuando son afectados, las lesiones se limitan al aparato reproductor. Las vías de infección son variadas, la más frecuente es el contacto con animales infectados.³ *B. ovis* afecta principalmente a machos, las lesiones son epididimitis, orquitis e infertilidad. Las principales vías de infección son la venérea y el contacto sexual entre ovinos machos.² Existe cierta especificidad de especie entre las diferentes brucelas y sus huéspedes naturales; sin embargo, es bien reconocida la capacidad de las diferentes brucelas para afectar a diferentes especies animales, los ovinos constituyen huéspedes naturales de *B. ovis* y *B. melitensis*. *B. ovis* ha sido descrita en Nueva Zelanda, Australia, Estados Unidos de América, Rusia, Repúblicas Checa y Eslovaca, Rumania, Hungría, Francia, Alemania, España, Canadá, Perú, Uruguay, Chile, Brasil y México.²

En México las brucelosis bovina y caprina son endémicas, la primera es causada por *B. abortus* y la segunda por *B. melitensis*. Sin embargo, no es raro encontrar a *B. melitensis* que infectan a bovinos y viceversa, sobre todo si se trata de explotaciones mixtas. En este último caso, es frecuente la explotación mixta de caprinos y ovinos; por lo que se debe considerar que al ser alta la presencia de *B. melitensis* en cabras (7%), ésta podría estar afectando en gran medida a los ovinos; este hecho, aunado a que los ovinos no se vacunan contra *B. melitensis*, pone de manifiesto la importancia de conocer la presencia y distribución de la enfermedad en ovinos de México.^{8,10,16}

En relación con *B. ovis* se sabe que está presente en México, pero se desconoce su distribución. El primer informe sobre su presencia fue en 1974,⁹ cuando se trabajaron 380 sueros de ovinos de la raza Pelibuey procedentes de diferentes estados de la República mexicana; en esa ocasión se encontró que 2.5% fue positivo a la prueba de fijación de complemento (FC). En el año de 1979 se realizó el primer aislamiento de *B. ovis* a partir de sementales Suffolk importados de Estados Unidos de América.¹⁵ Si bien *B. ovis* no es considerado como problema importante en hembras, en un estudio realizado en un hato del Estado de México que presentaba seropositividad a *B. ovis*

del 35% y se logró el aislamiento bacteriano, la fertilidad en hembras era del 40% y los abortos del 8%.⁵ En estudios serológicos realizados en el Estado de México (1987) y en Tlaxcala (1989), el porcentaje de hatos positivos fue de 47% para el primero y de 23.5% para el segundo.^{12,13} La enfermedad también ha sido notificada en el estado de Hidalgo y el Distrito Federal.^{14,10,11,16} Respecto del problema de brucelosis en ovinos causadas por brucelas lisas, sólo existe una notificación de animales seropositivos de la zona de Apaxco, en el Estado de México.¹⁷

La prueba más frecuentemente usada en la detección de anticuerpos contra brucelas lisas en ovinos es la de tarjeta, ya que ofrece rapidez, economía, alta especificidad y sensibilidad, además de que reúne las características de una buena prueba tamiz. Como prueba confirmatoria se recomienda la FC.^{4,8} Para el diagnóstico de *B. ovis* se han utilizado las pruebas de Coombs, FC, inmunoensayos enzimáticos (ELISA) e inmunodifusión doble en agar (IDD). Se han descrito diferentes antígenos para ser utilizados en las pruebas anteriormente mencionadas; sin embargo, el antígeno proteínico de extracción salina es el más recomendado para su uso en las pruebas de IDD y ELISA.^{7,8}

Con base en la importancia que las infecciones por *B. ovis* y brucelas lisas representan para la población ovina en México, así como la poca información al respecto, se consideró importante investigar la presencia de anticuerpos antibrucelas en sementales ovinos jóvenes procedentes de ocho estados de la República mexicana. Si bien es conocido que la infección por *B. ovis* es más común en sementales adultos y que las brucelas lisas afectan con mayor frecuencia a hembras adultas, se consideró importante conocer la seropositividad en esta muestra de ovinos machos jóvenes, ya que pone de manifiesto la importancia del problema de brucelosis en la población ovina.

Se utilizaron 622 sueros de ovinos machos jóvenes, de 6 a 11 meses de edad, de las razas Suffolk se tomaron 447; Black Belly, 116; Hampshire, 33, y Pelibuey, 26, procedentes de 39 explotaciones distintas. Seis se localizaron en Jalisco, 12 en el Estado de México, 2 en Tlaxcala, 11 en Hidalgo, 2 en Guanajuato, 1 en Nuevo León, 4 en Puebla y 1 en Veracruz; dichos estados estaban considerados entre los de mayor producción ovina (Cuadro 1). Los sementales a los que se les tomaron muestras, se incluían dentro del programa de ganado mejor, por lo que se les

Cuadro 1
LUGAR DE ORIGEN Y RAZA DE LOS ANIMALES ESTUDIADOS

Estado	Número de rebaños	Razas				Total
		Suffolk	Black Belly	Hampshire	Pelibuey	
Jalisco	6	0	87	0	0	87
México	12	215	18	0	26	259
Tlaxcala	2	35	0	0	0	35
Hidalgo	11	118	11	11	0	140
Guanajuato	2	21	0	22	0	43
Nuevo León	1	20	0	0	0	20
Puebla	4	34	0	0	0	34
Veracruz	1	4	0	0	0	4
Total	39	447	116	33	26	622

realizaron diferentes estudios para su evaluación; de estos últimos se decidió incluir el estudio serológico para brucela, con doble finalidad: para integrarlos dentro del programa y para conocer la importancia de la infección en este grupo de animales. Se determinó que el tamaño de la muestra fuera de la totalidad de los animales que fueron evaluados en este programa. La distribución de las muestras se presenta en el Cuadro 1.

Para el diagnóstico de la infección por *B. ovis* se utilizó la prueba de IDD, para la cual se describe una sensibilidad de 91.8% y una especificidad de 100%. Se utilizó un extracto proteínico salino como antígeno, este último se obtuvo a partir de la cepa REO 198 de *B. ovis* que es independiente de CO₂. Después de 48 h de incubación las células bacterianas se cosecharon en PBS, se centrifugaron a 7,500 g durante 15 min a 4°C y se lavaron con solución salina. Se determinó el peso celular húmedo, se ajustó a una concentración celular final de 6.6% en solución salina. La extracción del antígeno se realizó en autoclave a vapor fluente (100°C) durante 15 min, se centrifugó a 12,000 g por 15 min, a 4°C, el sobrenadante se dializó en una membrana, para posteriormente centrifugarlo a 7,500 g por 15 min a 4°C. El sobrenadante se ultracentrifugó a 100,000 g a 4°C por 6 h. El sedimento se resuspendió en la cantidad mínima suficiente de agua destilada y se liofilizó, permaneció en este estado hasta su utilización como antígeno, para lo cual se reconstituyó con agua destilada.^{2,8} Para la realización de la prueba se preparó un gel de agarosa al 0.8%, en solución amortiguadora de borato 30 mM, con pH de 8.3, se agregó solución salina al 11% y azida de sodio 0.1%. Para la realización del gel se virtieron 3 ml de la solución de agarosa en una laminilla de 7.5 x 2.5 cm, se dejó gelificar y se perforaron pocillos de 3 mm de diámetro a distancias de 3.5 mm en disposición de roseta de 6 pozos y uno central en el que se colocó el antígeno a una concentración final de 5 mg/ml. La cantidad de antígeno y de sueros que se depositó en los pocillos fue de 15 µl, se utilizaron testigos positivos en cada laminilla.^{2,8}

Para la detección de anticuerpos contra brucelas lisas se utilizaron las pruebas de rutina de tarjeta y FC. La prueba de tarjeta clásica con cc del antígeno al 8% se realizó según la técnica descrita por Alton *et al.*,¹ la cual presenta una sensibilidad de 78% y una especificidad de 100%. De acuerdo con lo notificado por Díaz,⁶ al trabajar con caprinos se decidió realizar una modificación de la técnica de tarjeta en la cual el antígeno se ajusta a una cc de 3%, esto último resulta en un incremento en la sensibilidad a 97% y la especificidad de 100%. La técnica de FC se utilizó únicamente como prueba confirmatoria probando sólo los sueros que fueron positivos a cualquiera de las dos modalidades de la prueba de tarjeta. Para la realización de la FC se siguió la descripción de Alton *et al.*¹ Todo suero con reacción positiva de 1:4 o mayor fue considerado como positivo.

En el Cuadro 2 se pueden apreciar los resultados de *B. ovis* por medio de la prueba de IDD, en los cuales se observa que 2.4% del total de sueros fueron positivos.

Cuadro 2
RESULTADOS DE LA PRUEBA DE INMUNODIFUSION DOBLE PARA EL DIAGNOSTICO DE *B. ovis* EN SUEROS DE 622 OVINOS PROCEDENTES DE OCHO ESTADOS DE LA REPUBLICA MEXICANA

Estado	Ovinos positivos	Ovinos negativos	Rebaños positivos	Rebaños negativos
Jalisco	2	85	3	3
México	3	256	1	11
Tlaxcala	0	35	0	2
Hidalgo	9	131	3	8
Guanajuato	0	43	0	3
Nuevo León	0	20	0	1
Puebla	1	0	1	3
Veracruz	0	0	0	1
Total	15 (2.4%)	607	8 (20.5%)	31

Cuadro 3
RESULTADO A LAS PRUEBAS DE TARJETA 8%, TARJETA 3% Y FIJACION DE COMPLEMENTO, PARA EL DIAGNOSTICO DE BRUCELAS LISAS EN SUEROS DE 622 OVINOS PROCEDENTES DE OCHO ESTADOS DE LA REPUBLICA MEXICANA

Estado	Rebaños positivos	Rebaños negativos	Tarjeta 8% cc*	Tarjeta 3% cc	FC**
Jalisco	3	3	0	5	0
México	5	7	4	7	3
Tlaxcala	0	2	0	0	0
Hidalgo	2	9	1	3	0
Guanajuato	1	1	0	2	0
Nuevo León	0	1	0	0	0
Puebla	0	4	0	0	0
Veracruz	0	1	0	0	0
Total	11 (28.2%)	28 (71.8%)	5 (0.8%)	17 (2.7%)	3 (0.48%)

* Concentración celular

** Fijación del complemento

Ocho rebaños resultaron afectados (20.5%). Los estados de Hidalgo, Puebla, Estado de México y Jalisco, presentaron por lo menos un hato positivo, por lo que se puede inferir la amplia distribución de *B. ovis*. Sin embargo, la distribución de animales positivos dentro de los rebaños no es amplia ya que sólo 15 animales presentaron anticuerpos contra *B. ovis*.

En relación con el número de sueros positivos a las pruebas de antígenos lisos de brucela, se puede apreciar en el Cuadro 3 que hubo 5 reactores a la prueba de tarjeta clásica, lo que representó 0.8%; en tanto que cuando se utilizó la técnica modificada, cc al 3%, existieron 17 sueros positivos, aumentando el porcentaje a 2.7%. Hubo 3 sueros positivos a FC, lo que representó 0.48% del total. Al analizar los resultados de brucelas lisas por rebaños, se observó que 11 (28.2%) fueron positivos, localizándose en los estados de Jalisco, Guanajuato, Hidalgo y Estado de México. De los cinco animales positivos a la prueba de tarjeta clásica todos fueron también positivos a la técnica modificada.

Era de esperarse el aumento de sueros positivos al utilizar la técnica modificada de tarjeta, en cc del antígeno al 3%, al incrementarse la sensibilidad, como lo notifican los trabajos realizados en otros países.^{4,6}

El número de animales detectados como positivos por la prueba de FC fue considerablemente menor al detectado por la prueba de tarjeta modificada, esto último coincide con los resultados de Blasco,³ quien describe una sensibilidad del 94% para la tarjeta modificada y de 88% para la FC. Sin embargo, como lo mencionan estos autores, es necesario que para el uso rutinario de la prueba de

tarjeta modificada, así como para el diagnóstico de brucelosis causada por brucelas lisas, debe de estandarizarse por medio de sueros patrones internacionales.³

Con base en los resultados presentados en este trabajo, se puede decir que la presencia de individuos seropositivos a brucelas lisas es importante al presentar 2.7% de animales y 28.2% de rebaños, en consecuencia deben diseñarse estrategias específicas para los ovinos, ya que éstas no se contemplan dentro de los programas oficiales de control y erradicación de la enfermedad.*

En referencia a *B. ovis* se observa que en trabajos realizados en México hace más de 20 años, la presencia era de 2.4%,⁹ esta cifra es similar a lo encontrado en este trabajo y en estudios recientes. Sin embargo, es de importancia el hecho de que en este trabajo se obtuvo seropositividad en 20.5% de los rebaños analizados.

Literatura citada

1. Alton, G.G., Jones, L.M., Angus R.D. and Verger, J.M.: Techniques for the Brucellosis Laboratory. INRA, Paris, France, 1988.
2. Blasco, J.M.: *Brucella ovis*. In: Animal Brucellosis. Edited by: Nielsen, K., Duncan, J.R., 351-378. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1990.
3. Blasco, J.M.: Evaluation of allergic and serological tests for diagnosing *Brucella melitensis* infection in sheep. *J. Clin. Microbiol.*, 32: 1835-1842 (1994).
4. Blasco, J.M., Marin, C., Barberan, M., Moriyon, I. and Diaz, R.: Efficacy of different Rose bengal and complement fixation antigens for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *Vet. Rec.*, 16: 415-423 (1994).
5. Boix, S.A.: Determinación de la incidencia de *Brucella ovis* en hembras de un rebaño ovino con antecedentes de epididimitis en un semental. Tesis de licenciatura. *Fac. Est. Sup. Cuautitlán*. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1987.
6. Díaz-Aparicio, E.: Diagnóstico serológico de la brucelosis caprina. Tesis de doctorado. *Universidad de Navarra*. Pamplona, España, 1993.

* NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales: *Diario Oficial de la Federación*. Comité Consultivo Nacional de Normalización de Protección Zoosanitaria, México, D.F., 1996.

7. Díaz, G.R. et Bosseray, N.: Identification d'un composé antigénique spécifique de la phase rugueuse (R) des *Brucella*. *Ann. Rech. Vet.*, 4: 238-250 (1973).
8. Ficapal, C.C.A.: Brucelosis ovina por *Brucella ovis*: Evaluación de pruebas diagnósticas y análisis de la incidencia en Cataluña. Tesis de doctorado. *Universidad Autónoma de Barcelona*. Barcelona, España, 1993.
9. Flores, C.R., Suárez, G.F. y Martínez, Y.E.: Presencia de *Brucella ovis* en borregos Tabasco. Memorias de la XI Reunión Anual INIP-SARH. México, D.F. 1974. 35. *Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias*. México, D.F. (1974).
10. Garibay, L.C.: Encuesta serológica de brucelosis en ovinos y caprinos, en cuatro diferentes ranchos del municipio de Tula, Hidalgo. Tesis de licenciatura. *Fac. de Med. Vet. y Zoot.* Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1986.
11. Hernández, A.M.: Determinación de la prevalencia de anticuerpos contra *Brucella ovis* en carneros de la zona de Topilejo. Tesis de licenciatura. *Fac. de Med. Vet. y Zoot.* Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1987.
12. Hernández, G.S. y Reyes, G.A.: Diagnóstico, prevalencia y descripción de la epididimitis ovina *Brucella ovis* en algunas explotaciones ovinas del Estado de México. Tesis de licenciatura. *Fac. de Med. Vet. y Zoot.* Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1987.
13. Jiménez, G.F.: Determinación de anticuerpos circulantes contra *Brucella ovis*, en borregos mediante dos técnicas serológicas, en el DDR 165 de Huamantla, Tlaxcala. Tesis de licenciatura. *Fac. de Med. Vet. y Zoot.* Universidad Autónoma de Tlaxcala. Tlaxcala, Tlaxcala, 1992.
14. Peña de la, M.A. y Feldman, S.D.: Aislamiento de *Brucella ovis* a partir de muestras de semen de carneros con epididimitis. Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México. México, D.F. 1985. 44. *Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, Universidad Autónoma de Chapingo*. México, D.F. (1985).
15. Pérez, E., Flores, C.R., Higuera de la, J.A. y Trigo, T.F.: Diagnóstico y descripción de un brote de epididimitis ovino en México originado por *Brucella ovis*. *Vet. Méx.*, 10: 221 - 226 (1979).
16. Ramos, R.H.: Determinación de anticuerpos contra *Brucella ovis* en suero de ovinos. Tesis de licenciatura. *Fac. de Med. Vet. y Zoot.* Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1986.
17. Romero, M.J.A., Moreno, C.B., López, M.A. y Tórtora, P.J.: Seroprevalencia de brucelosis en ovinos en un modelo de producción campesina en México. Memorias del VIII Congreso Nacional de Producción Ovina. Chapingo, Edo. de Méx., México. 1995. 167 -171. *Asociación Mexicana de Técnicos Especialistas en Ovinos*. México, D.F. (1965).