

PREPARACION Y EVALUACION
DE UN ANTIGENO PARA DESCARTAR RESPUESTA
POSTVACUNAL A *BRUCELLA ABORTUS* CEPA 19

Lautaro Pinochet V. (MV); Pedro Abalos P. (MV); María L. Sánchez CH. (MV, MS);
Iván Palavicino H. (MV, MS); María A. Vent C. (MV)

ANTIGEN FOR DISCARD *BRUCELLA ABORTUS* S 19
POST-VACCINAL RESPONSE:
PREPARATION AND EVALUATION

*A heat-aqueous-saline extracted and ethilic precipitated antigen from *Brucella abortus* strain 1119-3 was prepared and tested by immunodiffusion technique against sera from S19 vaccinated animals, field infected and negative cattle.*

It was confirmed that the precipitation reaction occur when infected bovines where tested, but not when vaccinated do it. The sensibility of this test was 86.4% and the specificity was 100%. Immunodiffusion test results were similar to standard sero-agglutination, bengal rose and complement fixation tests with sera from field infected and negative cattle. It is concluded that immunodiffusion test is a commendable test for the detection and differenciation of infected and vaccinated cattle, due to its low cost and easy performance.

Palabras claves: *Brucella abortus* cepa 19, brucelosis, bovinos, vacunas, antígenos / **Key words:** *Brucella abortus*, Strain 19, brucelosis, cattle, vaccines, antigens.

En las áreas donde se vacuna contra la brucelosis del bovino, es de importancia diagnóstica poder diferenciar si la reacción positiva que se produce con determinada prueba, obedece a que el bovino está realmente infectado o bien que la reacción es debida a la presencia de anticuerpos residuales de la vacunación, específicamente con Cepa 19.

En los últimos años, con el fin de evitar estos errores de diagnóstico, se han producido antígenos solubles, los cuales no contienen los lipopolisacáridos que participan como antígenos en la mayoría de las pruebas de diagnóstico de brucelosis (Dubray, 1984). Estos diferentes componentes génicos se han obtenido mediante extracción salina, fenólica, por ácido tricloro-acético, por sonicación u otros métodos (Díaz y col., 1968; Shuring y col., 1978;

Mc Mahon y col., 1980; Tabatabai y Deyoe, 1984; Díaz y col., 1984).

Díaz y col. (1979), mediante extracción por ácido tricloro-acético y a partir de la cepa de *Brucella melitensis* 115, obtuvieron un polisacárido que denominaron Poly B y que utilizado en pruebas de inmunodifusión radial era capaz de diferenciar sueros de bovinos infectados de aquellos de bovinos vacunados con Cepa 19. Blasco y col. (1984), también demostraron que este antígeno diferenciaba sueros de ovinos infectados de aquéllos vacunados con Cepa Rev 1.

Los polisacáridos obtenidos por distintos métodos han dado origen a los nombres de Poly B, hapteno nativo, hapteno ácido, etc., y aunque la estructura química de estos productos aún no está bien definida, tienen componentes comunes y un comportamiento inmunológico muy similar (Nielsen y col., 1988).

Las cualidades de estos antígenos han llevado a desarrollar diferentes técnicas para obtenerlos lo más purificados posible. Uno de los procedimientos más simples y económicos, es descrito por Díaz y col. (1981), referido a la extracción por calor, desde la cepa *Brucella melitensis* 16B y luego la purifica-

Trabajo financiado por Proyecto 59/83. Fondo Nacional de Investigación Científica y Tecnológica, Chile

Departamento de Medicina Preventiva Animal.
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias.
Universidad de Chile.
Casilla 2, Correo 15.
Santiago, Chile.

ción y concentración por medio de precipitación alcohólica.

En nuestro país se han preparado y evaluado antígenos solubles obtenidos por solución salina en caliente desde la Cepa 1119-3. A pesar de no estar separados los lipopolisacáridos del polisacárido, precipitaban diferenciadamente en las pruebas de inmunodifusión (Sánchez, 1988). Con anterioridad se prepararon y evaluaron antígenos sonicados a partir de la misma cepa de *Brucella*, los que diferenciaron sueros de animales infectados de los vacunados (Pinochet y col., 1986).

En la preparación de los antígenos de *Brucella* debe considerarse su costo, simplicidad de las técnicas utilizadas, seguridad para el personal que los prepara y eficiencia en los resultados, principalmente. El propósito de este estudio es preparar y evaluar un antígeno soluble que cumpla, en lo posible, con las condiciones citadas.

MATERIAL Y METODOS

Antígeno y prueba de inmunodifusión doble

Se utilizó como semilla la cepa *Brucella abortus* 1119-3, facilitada por el Centro Panamericano de Zoonosis OPS/OMS, controlándose su grado de disociación (Alton y col., 1976); se cultivó en Agar *Brucella* (Difco M.R.), en atmósfera normal, a 37°C por 72 h. La cosecha se realizó con un tampón fosfato salino 0,07M, pH 6,4, NaCl 0,15M (PBS). La suspensión bacteriana se centrifugó a 5.000 × g durante 30 minutos, se lavó resuspendiendo el precipitado en PBS por 3 veces. La pasta bacteriana obtenida se suspendió en un volumen de PBS equivalente a 6 veces su peso y fue calentada a 120°C en un autoclave por 60 minutos. Se centrifugó a 5.000 × g para eliminar el sedimento de cuerpos bacterianos y se repitió la centrifugación esta vez a 15.000 × g durante 20 minutos. El sobrenadante fue dializado contra salina tope pH 7,2 (920 ml de solución fisiológica y 80 ml de solución tope de Sørensen 0,07M) por 3 días a 4°C.

El producto obtenido fue sometido a una doble precipitación con etanol absoluto, según Díaz y col. (1981) y el precipitado resultante, fue resuspendido en agua destilada estéril, concentrándolo a 1/5 de su volumen inicial. Se mantuvo en alícuotas a -30°C hasta su uso.

Este antígeno fue titulado en sus contenidos de proteínas y hexosas mediante las pruebas de Folín y Anthrona, respectivamente (Hanson y Phillips, 1981).

La prueba de inmunodifusión doble en la que se usó este antígeno, se realizó en agarosa 0,4%, tampón fosfato salino 0,02M, pH 7,2, NaCl 0,15M y

thimerosal 0,01% como preservador, utilizando una roseta de perforación con pocillos separados por 2 mm del pocillo central. Realizadas las pruebas, se mantuvieron a 26°C en cámara húmeda y la lectura se efectuó a las 24, 48 y 72 horas. Se consideró reactores, los sueros que produjeron una línea clara de precipitación.

Sueros empleados

Se conformaron 3 grupos de sueros sanguíneos:

Grupo 1. Cincuenta y cinco sueros de hembras bovinas, obtenidos en la XII Región del país (Grupo negativo).

Grupo 2. Setenta y dos sueros de hembras bovinas jóvenes vacunadas con Cepa 19 entre los 3 y 8 meses de edad. Las muestras fueron obtenidas entre 20 y 140 días postvacunación (grupo vacunado).

Grupo 3. Veintidós sueros de bovinos adultos de los cuales se aisló *Brucella abortus* desde glándula mamaria o desde productos de aborto. Se descartó la posibilidad de que algunas de estas cepas fuera Cepa 19. Las técnicas de aislamiento y tipificación se basaron en Alton y col. (1976) (Grupo positivo).

Se incluyó en el estudio algunos antisueros preparados en conejos, contra bacterias que presentan alguna antigenicidad cruzada con *Brucella*, además del antisuero de *Brucella abortus* 1119-3. Todos fueron preparados por inoculación seriada de organismos muertos, sin la utilización de adyuvantes.

Pruebas serológicas

Los sueros de los grupos descritos fueron sometidos a las siguientes pruebas:

- Inmunodifusión doble (ID), ya citada.
- Seroaglutinación estándar (SAE) realizada según Alton y col. (1976), utilizando un antígeno entregado por el Centro Panamericano de Zoonosis OPS/OMS. Se utilizó la prueba rápida en placa.
- Rosa de bengala (RB) realizada según técnica recomendada por OPS/OMS (1982) utilizando un antígeno comercial (Bengatest M.R., IFFA Merieux, Francia).
- Fijación de complemento (FC) utilizando el método de microtítulo a 37°C (Alton, 1977), sólo a los Grupos 1, 2 y 3 de sueros.

Análisis estadístico

Se calculó especificidad y sensibilidad de la prueba de ID. Para las comparaciones de los resultados se utilizaron pruebas de hipótesis de independencia y de McNemar (Siegel, 1956).

RESULTADOS

Al utilizar la prueba de ID con el antígeno en estudio, se observó la formación de una línea nítida de precipitación, frente a los sueros reactivos. Los resultados se leyeron claramente a las 24 horas. Salvo en escasas oportunidades las líneas aparecieron a las 48 y 72 horas. Sólo en una oportunidad se observó, la presencia de una línea de precipitación agregada, notoriamente contaminante, que no tenía identidad con las líneas anteriormente citadas.

Los resultados de la prueba de ID estaban fuertemente asociados ($p < 0,001$) con los antecedentes de los sueros de los grupos 1 y 3, siendo la prueba de McNemar significativa ($p < 0,05$). En el cuadro 1 se puede evidenciar que la totalidad de los sueros provenientes de hembras vacunadas con Cepa 19 (grupo 2) no fueron reactivos a la prueba de ID.

CUADRO 1
RESULTADO DE LA PRUEBA DE
INMUNODIFUSION DOBLE (ID)
Y SU RELACION CON EL ANTECEDENTE
DE BRUCELOSIS DE DIFERENTES GRUPOS
DE SUEROS DE BOVINOS

Grupo	n	Prueba ID	
		negativos	positivos
1	55	55	0
2	72	72	0
3	22	3	19

La sensibilidad y especificidad de la prueba de ID, basándose en los antecedentes de los sueros positivos por cultivo y negativos, fue de 86,4% y 100%, respectivamente.

En el cuadro 2 se observa que existe concordancia entre los resultados de SAE e ID en los sueros del grupo 1. Las diferencias y cambios son significativos ($p < 0,001$) cuando se refieren a los sueros de animales vacunados. Ninguno de los 66 sueros reactivos a SAE (sospechosos y positivos) reaccionaron frente al antígeno en estudio. En el grupo 3, hubo asociación en los resultados de ambas pruebas ($p < 0,05$).

En el cuadro 3 se observa que hay concordancia en los resultados de RB e ID para los sueros del grupo 1 y una asociación significativa ($p < 0,05$) entre las dos pruebas para los sueros del grupo 3. En el grupo de sueros de hembras vacunadas se repite al igual que con SAE, una diferencia significativa ($p < 0,001$) entre los resultados de estas pruebas, siendo los cambios también significativos.

CUADRO 2
COMPARACION DE RESULTADOS
DE LAS PRUEBAS DE SEROAGLUTINACION
ESTANDAR (SAE) E INMUNODIFUSION
DOBLE (ID) EN SUEROS DE BOVINOS
CON DIFERENTES ANTECEDENTES
DE BRUCELOSIS

Grupo	n	Prueba SAE			Prueba ID	
		neg.	sosp.	pos.	neg.	pos.
1	55	55	0	0	55	0
		6			6	0
2	72		19		19	0
				47	47	0
3	22			22	3	19

CUADRO 3
COMPARACION DE LOS RESULTADOS
DE LAS PRUEBAS DE ROSA DE BENGALA (RB)
E INMUNODIFUSION DOBLE (ID)
EN SUEROS DE BOVINOS CON DIFERENTES
ANTECEDENTES DE BRUCELOSIS

Grupo	n	Prueba RB		Prueba ID	
		neg.	pos.	neg.	pos.
1	55	55	0	55	0
		12		12	0
2	72		60	60	0
3	22	0	22	3	19

En el cuadro 4 se observa que los resultados de la prueba de FC se comportan en forma similar a los de RB, en su relación con ID. Igualmente ninguno de los 61 sueros positivos a FC del grupo 2, dio reacción frente al antígeno utilizado en ID. Las diferen-

CUADRO 4
COMPARACION DE LOS RESULTADOS
DE LAS PRUEBAS DE FIJACION
DEL COMPLEMENTO (FC) E
INMUNODIFUSION DOBLE (ID)
EN SUEROS DE BOVINOS CON DIFERENTES
ANTECEDENTES DE BRUCELOSIS

Grupo	n	Prueba FC		Prueba ID	
		neg.	pos.	neg.	pos.
1	55	55	0	55	0
		11		11	0
2	72		61	61	0
3	22	0	22	3	19

cias de los resultados de las dos pruebas fueron significativas ($p < 0,001$).

De los antisueros de bacterias con antigenicidad cruzada con *Brucella*, sólo el de *Yersinia pseudotuberculosis* presentó notorias diferencias de resultados entre las pruebas usadas (cuadro 5).

CUADRO 5
RESULTADO DE LAS PRUEBAS
DE SEROAGLUTINACION ESTANDAR (SAE)
ROSA DE BENGALA (RB)
E INMUNODIFUSION DOBLE (ID)
UTILIZANDO ANTISUEROS DE BACTERIAS
QUE PRESENTAN ALGUNA ANTIGENICIDAD
CRUZADA CON *Brucella*

Antisuero	SAE	RB	ID
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	1:400	+	-
<i>Proteus mirabilis</i>	1:25	-	-
<i>Moraxella bovis</i>	1:25	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	1:25	-	-
<i>Brucella abortus</i> 1119-3	1:400	+	+

El análisis químico del antígeno en estudio, entregó los siguientes resultados: contenido de proteína, 230 μ /ml y contenido de hexosas, 127 μ g/ml.

DISCUSION

A diferencia del método descrito por Díaz y col. (1981), en la preparación de este antígeno no se utilizó *Brucella melitensis* 16M, sino que *Brucella abortus* 1119-3, cepa muy adaptada al laboratorio desde hace años, que crece bien en medios corrientes para este género, es escasamente disociable y tiene baja virulencia. Además, los cultivos obtenidos no fueron tratados con fenol para no alterar estructuras antigénicas antes del proceso de calentamiento.

Previo a esta experiencia, se habían estudiado antígenos calentados a diferentes temperaturas, optando finalmente por orientar el estudio sólo al que fue calentado a 120°C. Este antígeno mostró una línea única de precipitación y solamente en una de las pruebas se constató una línea contaminante. Esto indicaría que el antígeno ofrecía un estado de pureza adecuado para los efectos de esta experiencia.

La prueba de inmunodifusión fue de resultado precoz y en la mayoría de los casos se pudo leer a las 24 horas, lo que la hace bastante funcional. En la realización de la prueba influyó la concentración baja de agarosa que se usó como sustrato, ya que concentraciones mayores no permitieron obtener

resultados satisfactorios. Esto indicaría una poca difusibilidad del antígeno.

El método propuesto por Díaz y col. (1981) de extracción por doble precipitación alcohólica resultó práctico. El análisis del sedimento obtenido en la primera precipitación, indicó una cantidad de proteínas de 700 μ g/ml y de 610 μ g/ml de hexosas, generando dos líneas de precipitación en la prueba de ID, cuando fue enfrentado a sueros bovinos positivos por cultivo. Después de la segunda precipitación alcohólica, la cantidad de proteínas y hexosas resultó considerablemente menor y en los resultados de las pruebas de ID, se produjo sólo una línea de precipitación. De acuerdo a Díaz y col. (1979), se estimó que ésta correspondería a la presencia del hapteno nativo.

Las proteínas que acompañan a estos antígenos, al parecer no participan en la prueba, hecho que es corroborado por la ausencia de líneas agregadas. Esta condición también ha sido comprobada por Díaz y col. (1981). Además, se estima que las temperaturas alcanzadas en la preparación del antígeno desnaturalizarían o modificarían a éstas.

Para evaluar la eficiencia diagnóstica del antígeno en estudio, se recurrió a un esquema orientado a determinar su comportamiento frente a grupos de sueros cuyos antecedentes de brucelosis se conocían. Simultáneamente se compararon los resultados, con aquellos obtenidos por otras pruebas de diagnóstico como SAE, RB y FC. De esta manera se consideraron en mejor medida las recomendaciones de Alton y col. (1977), para evaluar una prueba de diagnóstico de brucelosis.

Debido a la poca confiabilidad de un diagnóstico bacteriológico negativo en brucelosis, se optó por recurrir a suero de bovinos de la XII Región del país, área donde nunca se ha vacunado y la enfermedad ha tenido sólo presentación esporádica. En los predios donde se obtuvo las muestras, la brucelosis nunca se había constatado.

El grupo de sueros de vacas positivas por aislamiento del agente, lamentablemente estaba constituido por un escaso número de muestras.

Basados en los antecedentes de los sueros de los grupos 1 y 3, la especificidad de la prueba de ID fue total y la sensibilidad alcanzó valores elevados, lo que la hacen utilizable como prueba de diagnóstico.

Las pruebas de SAE, RB y FC frente al grupo 3 de sueros, en apariencia, serían más sensibles que la prueba de ID. Frente a esta situación se podría aducir que el escaso número de muestras podría estar afectando los resultados. Además se estima que también podría deberse a problemas cuantitativos de los anticuerpos pues los tres sueros con resultado negativo a ID, presentaban los títulos más bajos de positividad a las pruebas SAE y FC, siendo los únicos con esta condición.

En relación a los antisueros usados como controles, cuando se realizó la prueba de ID frente al antisuero *Brucella abortus* 1119-3, la reacción no se produjo, lo que se atribuyó al hecho de haber utilizado *inoculum* muerto para la producción del antisuero. Al concentrar experimentalmente el antígeno la reacción de precipitación se manifestó. Esto indicaría la necesidad de conocer la concentración mínima aceptable de antígeno que debería usarse en la prueba.

Se sabe que los haptenos nativos o Poly B de *Brucella* son similares a los de *Yersinia enterocolitica* tipo 09 (Díaz y col., 1984). En esta experiencia se utilizó el antisuero *Yersinia pseudotuberculosis* que resultó rector a las pruebas de SAE y RB pero no a ID. En la preparación de suero anti-*Yersinia* en el conejo, igualmente se utilizó un *inoculum* muerto, por lo que se estima que el Poly B o el hapteno nativo no indujo respuesta inmune, al no existir una infección masiva, pero sí la indujeron los antígenos del complejo lipopolisacárido. Existiría también la alternativa de que *Y. pseudotuberculosis* no posea el antígeno polisacárido.

El hecho de que los animales vacunados no demuestren anticuerpos en las pruebas de ID contra el hapteno nativo ha sido explicado por Díaz y col. (1979) y corroborado por Wright (1988)*, lo que según nuestras experiencias previas, obedecería además a factores cuantitativos, de los antígenos o de los anticuerpos.

El comportamiento de la prueba de ID frente a los sueros de los bovinos vacunados (grupo 2) concuerda con aquellos obtenidos por Díaz y col. (1981) utilizando Poly B.

En general se puede concluir que el antígeno en estudio, luego de ser estandarizado y probado en un número mayor de muestras, podría ser de utilidad como prueba complementaria para diferenciar respuestas a las pruebas diagnósticas, que tengan origen postvacunal, de aquellas que sean debidas a infección natural. Además, por ser un antígeno de preparación fácil y de un manejo sin complicaciones, cualquier laboratorio, con implementación elemental podría incluirlo en su rutina de diagnóstico.

RESUMEN

Se preparó un antígeno por extracción acuosalina en caliente y posterior precipitación por etanol, a partir de *Brucella abortus* 1119-3, el que se enfrentó por

pruebas de inmunodifusión doble con sueros de bovinos infectados y negativos a brucelosis, y sueros de bovinos vacunados con Cepa 19. Se comprueba que la sensibilidad y especificidad de la prueba es de 86,4 y 100%, respectivamente, y que la reacción no se produce frente a los sueros de bovinos vacunados.

Los resultados son concordantes con aquellos de las pruebas de seroaglutinación estándar, rosa de bengala y fijación del complemento, cuando se refieren a los sueros de animales infectados y negativos a brucelosis, pero no a los sueros de bovinos vacunados. Se concluye que este antígeno, de fácil preparación y bajo costo, podría ser implementado para diferenciar respuestas serológicas que tengan origen postvacunal, de aquellas debidas a infección natural de brucelosis.

REFERENCIAS

- ALTON, G.G.; L.M. JONES; D.E. PIETZ. Las técnicas de laboratorio en la brucelosis. 2ª Ed. Ginebra. OPS/OMS. 1976. 175 p. Serie Monográfica N° 55.
- ALTON, G.G. Standardized complement fixation test for bovine brucellosis. Aust. Vet. J. 53: 394-400, 1977.
- ALTON, G.G. Development and evaluation of serological tests. In: Crawford, R., R. Hidalgo. Bovine Brucellosis: An International Symposium. Texas, USA. A. & M. University Press, 1977, pp. 61-71.
- BLASCO, J.M.; R. DÍAZ; I. MORIYON; D. SALVO. Evaluation of radial immunodiffusion test for diagnosing brucellosis in sheep and its possible value for differentiating infected from *Brucella melitensis*, Rev. 1 vaccinated sheep. Dev. Biol. Stand. 56: 507-511, 1984.
- DÍAZ, R.; L.M. JONES; D. LEONG; J.B. WILSON. Surface antigens of smooth *Brucella*. J. Bacteriol. 96: 893-901, 1968.
- DÍAZ, R.; P. GARATEA; L.M. JONES; I. MORIYON. Radial immunodiffusion test with *Brucella* polysaccharide antigen for differentiating infected from vaccinated cattle. J. Clin. Microbiol. 10: 37-41, 1979.
- DÍAZ, R.; J. TOYOS; M.D. SALVO; M.L. PARDO. A simple method for the extraction of polysaccharide B from *Brucella* cells, for used in radial immunodiffusion test diagnosis of bovine brucellosis. Ann. Rech. Vét. 12: 35-39, 1981.
- DÍAZ, R.; J. TOYOS; M.D. SALVO; L. FERNÁNDEZ-LAGOS; B. ALONSO; I. MORIYON; I. DORRONSORO. Studies on the polysaccharide B an native hapten of *Brucella* and *Yersinia enterocolitica* serotype 9. Dev. Biol. Stand. 56: 213-220, 1984.
- DUBRAY, G. Progrés récents sur la biochimie et les propriétés biologiques des antigènes de *Brucella*. Dev. Biol. Stand. 56: 131-150, 1984.
- HANSON, R.S.; J.A. PHILLIPS. Chemical composition. In: Gerhart, P. Manual of methods for general bacteriology. American Society for Microbiology, 1981, pp. 328-364.
- MC MAHON, J.J.; A. GERSTEN; J. COULL. Comparison of agar gel immunodiffusion test with other serological test for diagnosis of bovine brucellosis. North Dakota Research Report N° 78, July 1980, 7 p.
- NIELSEN, K.H.; P.F. WRIGHT; W.A. KELLY; J.H. CHERWONOGRODZKY. A review of enzyme immunoassay for detection of antibody to *Brucella abortus* in cattle. Vet. Imm. Immunopath. 18: 331-347, 1988.

*Comunicación personal: Dr. Peter F. Wright, Agriculture Canada, Animal Disease Research Institute, NEPEAN, Ontario, CANADA.

- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD / ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OPS/OMS). Pruebas suplementarias para el diagnóstico de la brucelosis. Centro Panamericano de Zoonosis. Bs. As. Argentina, 1982, 32 p.
- PINOCHET, L.; M.L. SÁNCHEZ; P. ABALOS; D. CASTILLO; I. PALAVICINO; M.A. TOCORNAL. Diagnóstico de brucelosis bovina por prueba de inmunodifusión doble, utilizando antígenos sonicados. Av. Cs. Vet. N° Extra. SA. 067, 1986.
- SÁNCHEZ, M.L. Contribución al diagnóstico de brucelosis bovina por pruebas de inmunodifusión en gel de agarosa. Tesis *Magister Scientiae*. Fac. Cs. Vet. y Pec. Universidad de Chile, 1988, 76 p.
- SHURING, G.G.; L.M. JONES; S.L. SPETH; D.T. BERGMAN. Antibody response to antigens distinct from smooth lipopolysaccharides complex in *Brucella* infection. *Infect. Immun.* 21: 994-1002, 1978.
- SIEGEL, S. Nonparametric statistics for behavioral sciences. New York. McGraw-Hill Book, 1956, 313 p.
- TABATABAI, L.B.; B.C. DEYOE. Characterization for salt extractable protein antigens from *Brucella abortus* by crossed immunoelectrophoresis and isoelectrofocusing. *Vet. Microbiol.* 9: 549-560, 1984.

Recibido el 8 de mayo de 1989.