

COMPARACION DE TRES CEPAS DE *Brucella melitensis* PARA LA OBTENCION DE ANTIGENO POLISACARIDO-B, UTILIZADO EN EL DIAGNOSTICO DE LA BRUCELOSIS BOVINA *

LUZ MINERVA CORTES MEDINA¹

EFREN DIAZ APARICIO¹

JESUS VAZQUEZ NAVARRETE¹

LOURDES ONTIVEROS CORPUS¹

INTRODUCCION

En México, la brucelosis del ganado bovino tiene una distribución muy amplia, el sureste es la zona de mayor incidencia, después el centro y las zonas costeras, y por último la parte norte del país donde disminuye en forma considerable, debido sobre todo a las condiciones de explotación, que en su mayoría son de tipo extensivo. Existe una incidencia muy alta de brucelosis en las cuencas lecheras del país, que es independiente a su localización geográfica, provocada por las condiciones de manejo, que en gran parte son de tipo intensivo y están sujetas a alta productividad, lo que hace al ganado más susceptible para contraer esta enfermedad (Rodríguez, 1978).

Entre las bases generales para el control y prevención de la brucelosis en bovinos se encuentran la identificación y eliminación de animales infectados, aunados a los programas de vacunación. En la brucelosis en particular, es

necesario distinguir entre anticuerpos (Ac) por infección natural y los producidos por reciente vacunación con la cepa 19 de *Brucella abortus* (Nicoletti, 1978; Díaz y col., 1979; Jones y col., 1980).

Las dificultades técnicas que ofrece el diagnóstico de esta enfermedad han creado la necesidad de desarrollar investigaciones que incrementen la eficiencia de las pruebas de laboratorio (Díaz y col., 1979; Jones y col., 1980).

En 1980, Jones y col., encontraron que la prueba de inmunodifusión radial (DR), con la utilización de un antígeno polisacárido, denominado polisacárido -B (poli-B), obtenido a partir de la cepa B-115 de *Brucella melitensis*, tuvo una especificidad alta (80%), en comparación con las pruebas de tarjeta (41.9%) rivanol (42.3%) y fijación de complemento (66%); aunque su sensibilidad fue menor (87.8%) comparada con fijación de complemento (97.6%), rivanol (99.5%) y tarjeta (100%).

El antígeno poli-B precipita en la prueba de DR con sueros de animales infectados, pero no con los sueros de animales vacunados con la cepa 19 de *B. abortus*. La prueba de DR con el antígeno poli-B puede ser aplicada a sueros de animales que recién han sido

* Trabajo financiado en parte por CONACYT. Clave PCAFBNA-020260.

¹ Proyecto Enfermedades Bacterianas de los Rumiantes. Centro Nacional de Investigaciones en Microbiología, Sector Pecuario, INIFAP-SARH. Km. 15.5 Carr. México-Toluca, C.P. 05110, México, D. F.

vacunados, lo que no es posible con otras pruebas serodiagnósticas de rutina, ya que las aglutininas posvacunales y anticuerpos fijadores de complemento aún están presentes, y por esta razón, existe un gran número de reactores positivos en dichas pruebas (Díaz y col., 1979).

Díaz y col., en 1968, demostraron por inmunoelectroforesis que extractos obtenidos de cepas lisas de **B. abortus** y **B. melitensis** con ácido tricloroacético, éter-agua y fenol-agua, contienen dos componentes de movilidad catódica. Uno de ellos ha sido identificado como un complejo LPS-proteína (S-LPS) con actividad endotóxica y especificidad para aglutinógenos superficiales de cepas lisas de **Brucella**. El otro componente se distingue por su facilidad de difundir en las pruebas de inmunoelectroforesis e inmunodifusión, carece de actividad endotóxica, posee gran cantidad de carbohidratos y ha sido llamado "componente-1", "segundo polisacárido" o "polisacárido-B" (Moreno y col., 1981; Díaz y col., 1968).

En apariencia este último componente no juega ningún papel de importancia en pruebas de aglutinación, ya que los Ac dirigidos contra este polisacárido, presentes en sueros de animales infectados, pueden ser removidos por adsorción con el antígeno específico, sin que se vean afectados los títulos de aglutininas en el suero (Díaz y col., 1979).

El antígeno poli-B se encuentra presente en la superficie celular de cepas lisas de **Brucella**, pero sólo se ha podido obtener a partir de la fracción soluble del citoplasma de cepas rugosas de la cepa B-115 de **B. melitensis**, según las investigaciones realizadas por Díaz y col., 1979 con experimentos de adsorción de cepas de **Brucella spp** (rugosas y lisas) y extractos sonicados de las mismas. Dichos resultados fueron confirmados por Moreno y col., 1981, cuando fracciones solubles del

citoplasma y de la membrana celular fueron extraídas con ácido tricloroacético y el poli-B pudo ser detectado sólo en la fracción citoplasmática de la cepa rugosa de **B. melitensis** B-115.

Además, debido a que las fracciones solubles del citoplasma quizá incluyan productos liberados del espacio periplásmico después de la ruptura de la célula, es probable que el poli-B sea un componente del espacio periplásmico.

En general, los diferentes análisis químicos practicados al poli-B revelan que este contiene: 83% de carbohidratos, 5% de ácidos nucleicos, 5% de proteínas; sin embargo, no contiene lípidos, 2-keto-3-Deoxioctonato (KDO), ni heptosas, como antes se había determinado (Carroll y col., 1978; Moreno y col., 1981). Las investigaciones químicas realizadas por Lacave y col., (1969), manifestaron los resultados de un importante estudio comparativo entre las fracciones LPS y polisacárido de **B. melitensis** y demuestran que la principal diferencia entre ambas fracciones es la presencia de pequeñas cantidades de lípido-A (1%) en el LPS. El comportamiento de fracciones LPS polisacárido sobre columnas de DEAE-celulosa es muy similar y las pequeñas diferencias observadas pueden ser explicadas por cambios debidos a la solubilidad del lípido-A, presente en el LPS.

El objetivo principal de este trabajo fue determinar cual de tres diferentes cepas de **B. melitensis**, dos lisas: 16-M y Rev-1, y una rugosa: B-115, producía una mayor cantidad de antígeno poli-B, utilizado en la prueba de DR para el diagnóstico de brucelosis bovina.

MATERIAL Y METODOS

El experimento fue llevado a cabo en dos fases:

La primera fase consistió en la obtención y comparación del rendimiento de los polisacáridos-B de tres diferentes cepas de **B. melitensis**: 16-M Rev-1 y B-115.

En la segunda fase se evaluó la efectividad diagnóstica de los tres polisacáridos-B obtenidos, ante la prueba de DR para diferenciar bovinos sospechosos a una infección por **Brucella** de aquellos animales vacunados con la cepa 19 de **B. abortus** (tanto con dosis reducida, como con dosis normal).

FASE I. Extracción de los polisacáridos-B de tres cepas de **B. melitensis**.

Se utilizaron tres cepas de **B. melitensis** (provenientes del cepario del Proyecto de Enfermedades Bacterianas de los Rumiantes, Sector Pecuario, INIFAP-SARH) dos de ellas lisas: 16-M y Rev-1 una rugosa B-115.

Las diferentes cepas de **B. melitensis** fueron cultivadas en forma individual, según la técnica descrita por Alton y col., (1975), en frascos de Roux con medio sólido de tripticasa-soya; se incubaron durante 48 h a 37°C en una estufa bacteriológica, para después cosecharse con una solución de cloruro de sodio 0.15 M (Alton y col., 1975; Díaz y col., 1979).

La obtención del antígeno poli-B se basó en la extracción con ácido tricloroacético 0.5 M y posterior precipitación con etanol frío al 95% (Díaz y col., 1979).

Se empleó el mismo método para la extracción independiente de las cepas utilizadas; se realizaron tres repeticiones para la obtención de poli-B a partir de las diferentes cepas de **B. melitensis**. El paquete celular húmedo de cada cepa fue ajustado en la extracción correspondiente, a un mismo peso, con el fin de establecer una comparación real entre el rendimiento de la producción de poli-B de las distintas cepas.

La cuantificación de poli-B contenido en cada ml de solución de los diferentes antígenos se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Dubois y col., (1956) en la que se determina la cantidad de carbohidrato por referencia a una curva estándar de glucosa. Las lecturas fueron realizadas en el espectrofotómetro*, con una longitud de onda de 490 nm. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

El análisis estadístico utilizado para la comparación del rendimiento (en μg) en cuanto a la producción de poli-B a partir de las tres cepas de **B. melitensis** fue: análisis de varianza (ANDEVA) y la prueba de significancia de Tukey (Wayne, 1979).

FASE II. Evaluación de la efectividad de los polisacáridos-B obtenidos.

Se examinaron un total de 61 sueros de bovinos que fueron clasificados dentro de cuatro grupos.

A todos los sueros se les realizaron las siguientes pruebas serológicas de rutina, según la técnica descrita por Alton y col., (1975), con el fin de determinar la presencia de Ac contra **Brucella**:

- i) Prueba de tarjeta.
- ii) Prueba de aglutinación lenta en tubo.
- iii) Prueba de aglutinación con 2-Mercaptoetanol (2-ME).

A estos sueros se les realizó después la prueba de DR, con el empleo de los polisacáridos-B obtenidos de las cepas 16-M, Rev-1 y B-115 de **B. melitensis**.

El gel fue preparado con agarosa al 1.6% disuelta en amortiguador glicina-NaOH 0.1M pH = 8.6. Por otro lado, los polisacáridos-B de cada una de las diferentes cepas de **B. melitensis** (previa liofilización) se colocaron también en amortiguador glicina-NaOH

* Spectronic-20 de Bausch & Lomb.

0.1M pH = 8.6, adicionado con un 20% de cloruro de sodio, para obtener una concentración final de polisacárido-B entre 40 - 42 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de gel (Díaz y col., 1979). Luego se mezclaron volúmenes equivalentes del gel con cada una de las soluciones de poli-B, ambos a 65°C en baño maría, y se depositaron 4 ml de la mezcla correspondiente en cajas petri de vidrio (con un diámetro de 5.5 cm), colocadas sobre una superficie plana. Se dejaron solidificar los geles que quedaron con un espesor de 2 mm y un diámetro de 5 mm, en cada pozo se colocaron 25 μl de suero (Díaz y col., 1979; Morilla y Bautista, 1986).

Los cuatro grupos de sueros de los bovinos estuvieron constituidos de la siguiente manera:

a) Grupo I: Se incluyeron 15 sueros de animales sospechosos a una infección por **Brucella**, con base en los resultados de las pruebas serológicas antes realizadas.

b) Grupo II: Estuvo constituido por 15 sueros de bovinos, seleccionados al azar y muestreados después de un año de la vacunación en edad adulta, con la dosis reducida (3×10^9 U.F.C./ml) de la cepa 19 de **B. abortus**.

c) Grupo III. Fue compuesto por 15 sueros de bovinos, seleccionados al azar y muestreados después de un año de la vacunación entre los tres y seis meses de edad con la dosis completa (9×10^{10} U.F.C./ml) de la cepa 19 de **B. abortus**.

d) Grupo IV: Lo integraron 15 sueros de animales sin antecedentes de vacunación con la cepa 19 de **B. abortus** y negativos a las pruebas serodiagnósticas realizadas con anterioridad.

Además se utilizó un suero control positivo de referencia, donado por el National Animal Disease Laboratories Center U.S. Department of Agriculture, Ames, Iowa.

RESULTADOS Y DISCUSION

El Cuadro 1 presenta los resultados obtenidos en el rendimiento de antígeno polisacárido-B de las cepas 16M, Rev-1 y B-115 de **B. melitensis**, con base en 1 g de peso húmedo de bacterias, utilizado para llevar a cabo la extracción del antígeno.

En estudios previos, diversos autores (Díaz y col., 1979; Jones y col., 1980), con el empleo del método utilizado en este trabajo para la extracción de poli-B a partir de la cepa B-115 de **B. melitensis**, han demostrado que dicho antígeno precipita en la prueba de DR sólo con sueros de animales infectados.

Ontiveros y Tenorio, (1984) utilizaron la cepa lisa de **B. melitensis** Rev-1 para la obtención de poli-B y mostraron que dicho antígeno puede utilizarse con bastante eficiencia en la prueba de DR para diferenciar bovinos infectados en forma natural, de aquellos animales vacunados con la cepa 19 de **B. abortus**.

En 1981, Díaz y col., concluyen que el polisacárido-B obtenido a partir de la cepa lisa 16M de **B. melitensis** por la vía inmunológica no puede distinguirse del polisacárido-B obtenido de la cepa rugosa B-115 de **B. melitensis** y del polisacárido-B presente en la fracción 5 de Redfearn.

Sin embargo, no se había llevado a cabo una comparación entre las diferentes cepas de **B. melitensis** (dos lisas: 16-M y Rev-1, y una rugosa: B-115), bajo condiciones similares de experimentación, pesos constantes de paquete celular para cada cepa y un mismo método de extracción y cuantificación del polisacárido, con la finalidad de evaluar cuál de ellas producía una mayor cantidad del antígeno polisacárido-B utilizado en la prueba de DR para el diagnóstico de brucelosis bovina.

CUADRO No.1.- COMPARACION DEL RENDIMIENTO DE ANTIGENO POLISARIDO B (Mg) ENTRE TRES CEPAS DE Brucella melitensis, A PARTIR DE 1 g DE PAQUETE CELULAR HUMEDO.

Repetición	Cepas de <u>Brucella melitensis</u>		
	16 M	Rev 1	B-115
1	143.2	94.5	28.5
2	203.4	175.0	72.1
3	363.1	337.5	123.6
\bar{X}	236.6 ^a	202.3 ^a	74.7 ^b

a.b. Valores con distinta literal muestran diferencia estadística ($P < 0.05$)

En el Cuadro 1 puede apreciarse que la cantidad de poli-B obtenida a partir de las cepas lisas (16-M y Rev-1) de **B. melitensis** fue mucho mayor que la producida por la cepa rugosa (B-115) de **B. melitensis**, al respecto, Díaz y col., (1981), encuentran diferencias importantes en el rendimiento de polisacárido-B obtenido a partir de dos cepas de **B. melitensis**; y notifican un rendimiento del 1.5% para la 16-M, contra 0.5% obtenido de la B-115, lo que concuerda con los resultados del presente trabajo, en el que se encontró que las cepas lisas de **B. melitensis** (16-M y Rev-1) tuvieron un rendimiento de polisacárido-B casi tres veces mayor que el de la cepa rugosa (B-115) de **B. melitensis**.

En el Cuadro 1 se muestran los resultados del análisis estadístico que compara el rendimiento obtenido de los tres diferentes polisacáridos-B.

El análisis estadístico utilizado para la comparación del rendimiento de polisacárido-B obtenido a partir de cada cepa, no mostró una diferencia estadística significativa entre las cepas

lisas (16-M y Rev-1) sin embargo, al comparar estas dos con la cepa rugosa (B-115) si se encontró diferencia ($P < 0.05$).

Evaluación de la efectividad de los tres diferentes polisacáridos-B:

En el Cuadro 2 se presenta el comportamiento de los 61 sueros de bovinos muestreados, tanto de las pruebas serológicas de aglutinación, como de la prueba de inmunodifusión radial, con la utilización de tres diferentes polisacáridos-B obtenidos.

En el Grupo I de bovinos sospechosos a la infección por **Brucella**, 13 resultaron positivos a aglutinación con 2 mercaptoetanol (2-ME), 12 fueron positivos con títulos de 1:200 y uno con título de 1:100, estos 13 sueros dieron positividad en la prueba de IDR con los tres diferentes polisacáridos-B. Es importante notar en el Gupo II que el total de animales vacunados con dosis reducida (3×10^9 U.F.C/ml) de cepa 19 de **B. abortus**, son positivos a la prueba de aglutinación en tubo con títulos diferentes, pero sólo cuatro de ellos son positivos a la prueba de aglutina-

CUADRO No. 2.- RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE AGLUTINACION Y DE INMUNODIFUSION RADIAL EXPRESADOS EN PORCENTAJES, DE LOS CUATRO GRUPOS DE BOVINOS MUESTREADOS.

	tarjeta		Aglutinación en tubo					Aglutinación con 2-Mercaptoetanol					Inmunodifusión Radial					
	-	+	-	Aglutinación en tubo				Aglutinación con 2-Mercaptoetanol					16 M		REV 1		B-115	
				1:25	1:50	1:100	1:200	-	1:25	1:50	1:100	1:200	-	+	-	+	-	+
Grupo I	0	100	0	0	0	6.6	93.4	0	13.4	0	6.6	80	13.4	36.6	13.4	66.6	13.4	66.6
Grupo II	46.6	53.4	0	26.6	46.6	6.6	29.2	53.4	20	26.6	0	0	100	0	100	0	100	0
Grupo III	46.6	53.4	33.3	20	33.3	0	13.4	56.6	13.4	6.6	0	13.4	86.6	13.4	66.6	13.4	36.6	13.4
Grupo IV	100	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	100	0	100	0
Control +	100	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	100	0	100	0	100

ción con 2-ME con título de 1:50. Todos los animales de este grupo fueron negativos en la prueba de DR con los tres polisacáridos-B.

Por lo que respecta al Grupo III, de animales vacunados con dosis normal (9×10^{10} U.F.C./ml) de la cepa 19 de *B. abortus*, los sueros de dos animales resultaron positivos en la prueba de DR con los tres polisacáridos-B, sin embargo, estos sueros también fueron positivos en las pruebas de aglutinación en tubo y con 2-ME, en los que presentaron títulos muy elevados.

En el último Grupo (IV) todos los animales resultaron seronegativos, tanto en las pruebas de aglutinación como en la de DR. El suero control positivo presentó títulos elevados de 1:200 en todas las pruebas y pudo observarse la formación de un halo de precipitación en la prueba de DR con los tres diferentes polisacáridos-B.

Con respecto a la evaluación de la efectividad de los diferentes polisacáridos-B al ser utilizados en la prueba de DR, Ontiveros y Tenorio, (1984), con el empleo de poli-B obtenido a partir de la cepa Rev-1 de *B. melitensis* encontraron un 94% de reactores positivos en un grupo de animales infectados; sólo un 11% de reactores positivos en animales vacunados con dosis normal (9×10^9 U.F.C./ml) de la cepa 19 de *B. abortus* y un 3% de reactores positivos en animales vacunados con dosis reducida (4.5×10^8 U.F.C./ml) de cepa 19 de *B. abortus*. Estos datos concuerdan con los obtenidos en este trabajo, ya que resultó un 86.6% de reactores positivos en el grupo de animales sospechosos a una infección por *Brucella*; un 13.3% de reactores positivos en animales vacunados con dosis normal (9×10^{10} U.F.C./ml) y un 0% en animales vacunados con dosis reducida (3×10^9 U.F.C./ml).

Por otro lado, Díaz y col., (1981) con el uso de poli-B obtenido a partir de la cepa 16-M de *B. melitensis*, en la prueba de DR, notifican un 78.3% de reactores positivos en animales sospechosos a una infección por *Brucella*; 88.6% de positivos en animales infectados en forma experimental con una cepa virulenta de *B. abortus*, aunque en animales vacunados tanto con dosis reducida (5×10^9 U.F.C./ml) como con dosis completa (9×10^{10} U.F.C./ml) de la cepa 19 de *B. abortus*, no encontraron ningún reactor positivo.

Al emplear el poli-B extraído de la cepa B-115 de *B. melitensis*, Jones y col., (1980) encontraron en animales infectados en forma experimental, un 90% de reactores positivos en la prueba de DR; en animales vacunados con dosis normal (7.8×10^{10} U.F.C./ml) presentan un 4.3% de positivos y ningún reactor positivo en el grupo de animales vacunados con dosis reducida (5×10^9 U.F.C./ml) de la cepa 19 de *B. abortus*. Como puede observarse en el Cuadro 2, en este trabajo se encontraron resultados similares al usar los tres diferentes polisacáridos en la prueba de DR.

CONCLUSIONES

Las cepas lisas de *B. melitensis* (16-M y Rev-1) fueron las más adecuadas para la obtención del polisacárido-B, ya que el rendimiento en μg obtenido a partir de éstas, fue casi tres veces mayor que el de la cepa rugosa (B-115) de *B. melitensis*.

Las cepas lisas (16-M y Rev-1) de *B. melitensis* presentaron un rendimiento similar en cuanto a la producción de polisacárido-B, sin embargo, es importante señalar que la cepa 16-M es más virulenta que la Rev-1 y por lo tanto, su manipulación en el laboratorio implica mayores riesgos.

Al aplicar la prueba de DR, con cada uno de los polisacáridos-B obtenidos, se pueden diferenciar animales sospechosos de una infección por brucelas de los que fueron vacunados, ya sea con dosis reducida o dosis completa, de la cepa 19 de **B. abortus**.

LITERATURA CITADA

- ALTON, G.G., JONES, M.L. and PIETZ, D.F., 1975. Laboratory techniques in brucellosis, **World Health Organization**, Geneva, Monograph Series, 2nd. Ed., No. 55.
- CARROLL, J.A., McNAUGHT, D.J., BOURKE, A.A. and ALLAN, G.S., 1978. The Diagnostic efficiency of some serological test for bovine brucellosis. **J. Hyg.** 80:365.
- DIAZ, R., JONES, M.L., LEONG, D. and WILSON, J.B., 1968. Surface antigens of smooth **Brucella**. **J. Bact.** 96:893.
- DIAZ, R., GARATEA, P., JONES, M.L. and MORIYON, I., 1979. Radial immunodiffusion test with a **Brucella** polysaccharide antigen for differentiating infected from vaccinated cattle. **J. Clin. Microbiol.** 10:37.
- DIAZ, R., TOYOS, J. SALVO, M.D. and PARDO, M.L., 1981. A simple method for the extraction of polysaccharide-B from **Brucella** cells for use in the radial immunodiffusion test diagnosis for bovine brucellosis. **Ann.Rech. Vet.** 12 (1):35.
- DUBOIS, M., GILES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. and SMITH, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.** 28:350.
- JONES, L.M., BERMAN, D.T., MORENO, E., DEYOE, B.L., GILSDORF, M.I., HUBER, I.D. and NICOLETTI, P., 1980. Evaluation of a radial immunodiffusion test with polysaccharide-B antigen for diagnosis of bovine brucellosis. **J. Clin. Microbiol.** 12:753.
- LACAVE, C.I., ASSELINEAN, A.S., and ROUX, I., 1969. Comparison de la composition chimique d'une polysaccharide que isolees de **Brucella melitensis**. **Eur. J. Biochem.** 9:189.
- MORENO, E., SPETH, S.L., JONES, L.M., and BERMAN, D.T., 1981. Immunological characterization of **Brucella** lipopolysaccharides and polysaccharides. **Infect. Immun.** 31:214.
- MORILLA, G.A. y BAUTISTA, G.C., 1986. Manual de Inmunología. 1a. Ed. **Editorial DIANA**, México, D.F. p. 423.
- NICOLETTI, D., 1978. Diagnóstico de brucelosis: Algunos problemas y nuevos descubrimientos. Memorias del Foro Nacional sobre Brucelosis. INIP-ENEP C-UNAM. México, D.F., p.67.
- ONTIVEROS, C.L. y TENORIO, G.V., 1984. Avances en la utilización de la prueba de inmunodifusión radial con un antígeno polisacárido-B de **Brucella melitensis** cepa Rev-1 para el diagnóstico de brucelosis bovina. Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México. México, D.F. p. 177.
- RODRIGUEZ, H.G., 1978. Epizootiología de la brucelosis. Memorias del Foro Nacional sobre Brucelosis. INIP-ENEP C-UNAM, México, D.F. p.10.
- WAYNE, W.D., 1979. Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud. 1. Ed., **Editorial LIMUSA**; México, D.F., p. 193.