

## DIAGNOSTICO DE *Brucella melitensis* EN OVINOS USANDO INMUNODIFUSION RADIAL CON HAPTENO NATIVO<sup>a</sup>

Efrén Díaz-Aparicio<sup>b, e</sup>  
Ignacio Moriyón Uría<sup>c</sup>  
José María Blasco Martínez<sup>d</sup>  
Clara Marin Alcalá<sup>d</sup>  
Ramón Díaz García<sup>c</sup>

### RESUMEN.

El objetivo del trabajo fue determinar la sensibilidad y especificidad de la inmunodifusión radial con el hapteno nativo de *Brucella* serotipos A, M y de *Yersinia enterocolitica* O:9, para el diagnóstico de brucelosis en ovinos. El hapteno nativo se preparó a partir de las cepas de *B. melitensis* 16M y Rev 1, *B. abortus* 2308 y *Y. enterocolitica* O:9. Las placas para la inmunodifusión radial se prepararon con agarosa y 10% de NaCl en solución amortiguadora de borato, para los polisacáridos de *B. abortus* y *Y. enterocolitica* y con solución amortiguadora de glicina para el hapteno nativo de *B. melitensis*; se utilizaron tres concentraciones de HN para cada suero. Se usaron sueros de 85 ovinos con infección demostrada por aislamiento bacteriológico de *B. melitensis* biotipo 1, sueros de 77 ovinos negativos a brucelosis procedentes de zonas libres y 42 de ovinos vacunados con diferentes protocolos de vacunación. La sensibilidad de la inmunodifusión radial con el hapteno nativo de *B. melitensis* fue del 95%. Para el hapteno nativo de *B. abortus* la sensibilidad fue del 60%. El hapteno nativo de *Yersinia* tuvo una sensibilidad del 35%. Para los animales negativos la especificidad fue en todos los casos del 100%. La especificidad en animales vacunados presentó valores de 90 a 100% según el protocolo de vacunación usado. La vacunación conjuntival induce menores persistencias en todas las especies y pruebas diagnósticas.

PALABRAS CLAVE: Ovinos, *Brucella melitensis*, Hapteno nativo.

Tec. Pecu. Mex. Vol. 34 No. 2 (1996).

### INTRODUCCION.

En México se desconoce la magnitud de la presencia de *B. melitensis* en ovinos, Nuñez y col.(1) refieren la presencia de anticuerpos contra brucelas lisas en sementales jóvenes ovinos en un estudio que abarco 622 animales, realizado con muestras procedentes de 39 ranchos de ocho estados de la República, encontrando una prevalencia del 2.7%. Otros autores(2) refieren un estudio en siete rebaños ovinos del Edo. de México, en los cuales encontraron que en cuatro de los rebaños había anticuerpos contra brucelas lisas.

En México la brucelosis caprina y bovina es un padecimiento endémico y la vacunación en ovinos casi nula, por lo que debe dársele a la brucelosis ovina la importancia que merece dentro de los programas de control. La inmunodifusión radial (IDR) con el hapteno nativo (HN) es una prueba confirmatoria sencilla y económica que ha demostrado su efectividad en bovinos y caprinos (3), pudiendo ser una alternativa para el diagnóstico de la brucelosis ovina, además de la fijación del complemento (FC) y el rosa de bengala (RB); por lo que, el objetivo de este trabajo fue determinar la sensibilidad y especificidad de la IDR con el HN preparado a partir de brucelas serotipos A, M y *Yersinia enterocolitica* O:9 para el diagnóstico de brucelosis en ovinos.

<sup>a</sup> Recibido para su publicación el 15 de septiembre de 1995.

<sup>b</sup> CENID-Microbiología, INIFAP-SAGAR.

<sup>c</sup> Facultad de Ciencias, Universidad de Navarra, España.

<sup>d</sup> Depto. Producción Animal Diputación de Aragón, España.

<sup>e</sup> Depto. de Microbiología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

Correspondencia: Efrén Díaz Aparicio. CENID Microbiología INIFAP. Apartado postal 41682. México, 11001, D.F. 570-38-86.

Este trabajo contó con el apoyo del Proyecto GAN90-0935-CQ2 del Programa Nacional de Investigación y Desarrollo Ganadero del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España. El trabajo forma parte de la tesis doctoral del primer autor, realizada con apoyo del CONACYT.

### MATERIALES Y METODOS

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Microbiología de la Universidad de Navarra y en el laboratorio de Bacteriología del CENID Microbiología del INIFAP.

Sueros de ovinos. Se obtuvieron muestras de suero de los siguientes grupos de animales: a) 85 ovinos con infección natural y con aislamiento de *B. melitensis* (biotipos 1 y 3). b) 77 ovinos de hatos libres de *Brucella* del Estado de México, México. c) 11 corderos vacunados con *B. melitensis* Rev 1 con diferentes protocolos de vacunación, por vía subcutánea con  $2 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias (ufc), a los tres meses de edad. d) 11 corderos vacunados por vía conjuntival con  $2 \times 10^9$  ufc, a los tres meses de edad. e) 10 ovinos adultos vacunados subcutáneamente con  $1.5 \times 10^9$  ufc. f) 10 ovinos adultos vacunados conjuntivamente con  $1.5 \times 10^9$  ufc. Los grupos a, c, d, e y f procedentes de Aragón, España.

Los ovinos vacunados fueron sangrados al 1<sup>o</sup>, 3<sup>o</sup> y 4<sup>o</sup> mes posvacunación. El aislamiento e identificación de las cepas se realizó siguiendo la técnica descrita por Alton (4).

Cepas bacterianas. Se utilizaron las cepas de *B. melitensis* 16M, *B. melitensis* Rev 1, *B. abortus* 2308 y *Y. enterocolitica* O:9.

Cultivos para la preparación de extractos celulares. Los cultivos se realizaron a 37 C durante 48 h para las brucelas y a 26 C durante 24 h para la *Yersinia*. Las células se cosecharon por filtración tangencial, en un sistema Pellicon (Millipore Corp.), provisto de un filtro PTHK 000C5 (Millipore Corp.).

Obtención de HN. Las células fueron resuspendidas en agua destilada en la proporción de 30 g de peso húmedo por 100 ml. Esta suspensión se esterilizó a 120 C durante 15 min y tras enfriarla a temperatura ambiente; los restos celulares se eliminaron por centrifugación a  $12.000 \times g$  durante 15 min. El sobrenadante obtenido fue precipitado primeramente con tres volúmenes (300 ml) de etanol al 95%, manteniendo la mezcla a 4 C durante 18 h, con agitación continua. El precipitado (primer precipitado enriquecido en LPS), fue recolectado ( $5.000 \times g$ , 4 C, 10 min), en agua destilada y

dializada contra agua destilada ( $2 \times 100$  volúmenes), a 4 C y liofilizado. Al sobrenadante agua-etanol del primer precipitado, se le añadieron dos volúmenes (200 ml) de etanol al 95% y la mezcla se mantuvo a -20 C durante 18 h. El precipitado resultante (segundo precipitado, HN) se recolectó por centrifugación ( $5.000 \times g$ , 5 C, 5 min), se dializó contra agua destilada y se liofilizó (5).

Pruebas serológicas RB y FC. Para el RB se usó un antígeno en suspensión de solución amortiguadora de lactato de células completas de la cepa *B. abortus* 1119-3. La prueba se realizó en placas blancas esmaltadas, depositando 0.03 ml de antígeno y 0.03 ml ó 0.12 ml de suero y agitando lentamente durante 4 min (4). La prueba de FC fue realizada usando como antígeno una suspensión de células completas de *B. abortus* 1119-3, utilizando una microtécnica estándar con fijación en caliente (antígeno, suero y complemento, 30 min a 37 C) (4).

IDR con HN. Para la realización de esta prueba, se siguió el método descrito por Díaz y col. (6), variando las condiciones según el tipo de HN. Estas condiciones se determinaron en experimentos previos, en los que se variaron las concentraciones de polisacáridos y el tipo de solución amortiguadora. Las soluciones amortiguadoras ensayadas fueron: solución amortiguadora de borato (pH 8.6), con 10% de NaCl, solución amortiguadora de glicina-NaOH 0.12 M pH 7.8, 10% NaCl (7), y solución amortiguadora de 0.1 M Tris HCl (pH 7.2), y 10% de NaCl. Las pruebas se realizaron como sigue:

A) HN de *B. melitensis* 16M y Rev 1. El gel se preparó mezclando el HN en solución amortiguadora de glicina, con un volumen igual de agarosa (Indubiosa A37 HAA, IBF) al 1.6%, previamente fundida y equilibrada a 60 C. Las concentraciones de polisacárido que se utilizaron para el diagnóstico fueron: 5, 10 y 20  $\mu g/ml$ .

B) HN de *B. abortus* 2308. La IDR se realizó

en un gel de agarosa en solución amortiguadora borato. Las concentraciones de polisacárido que se utilizaron para el diagnóstico fueron: 20, 30 y 50 µg/ml.

En todos los casos, los geles fueron hechos en placas de Petri de 50 x 9 mm, Falcon 1006 (Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, N.J.) que se usaron 48 horas después de preparados. Los sueros se colocaron en pocillos de 4 mm de diámetro y las lecturas se hicieron a las 4 y 24 h de incubación a temperatura ambiente.

Sensibilidad y especificidad de las pruebas serológicas.

Se emplearon en la valoración de los datos los siguientes parámetros:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{positivos verdaderos} \times 100}{\text{positivos verdaderos} + \text{falsos negativos}}$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{negativos verdaderos} \times 100}{\text{negativos verdaderos} + \text{falsos positivos}}$$

## RESULTADOS

A. Ovinos de los grupos control (Cuadro 1).

En los ovinos infectados con *B. melitensis* biotipo 1, la sensibilidad de la IDR con el HN de *B. melitensis* 16M, fue 1.6 y 2.8 veces mayor que la obtenida con el HN de *B. abortus* 2308 y el HN de *Y. enterocolitica* O:9, respectivamente; estas diferencias fueron particularmente claras en los animales con títulos bajos de FC.

En el grupo de ovinos infectados con *B. melitensis* biotipo 3 (Cuadro 1), los

resultados fueron diferentes. La sensibilidad de la IDR con HN de *B. melitensis* 16M, fue sólo un poco menor que aquella obtenida en el grupo de las ovejas infectadas con *B. melitensis* biotipo 1. En cambio, la sensibilidad obtenida con el HN de *B. abortus* 2308 y el HN de *Y. enterocolitica* O:9, se incrementó considerablemente  $p < 0.077$  y  $0.001$  respectivamente, utilizando las diferentes concentraciones de HN. Para ambos grupos, los resultados positivos de la prueba de IDR con HN de *B. melitensis* 16M se correlacionaron con los títulos de FC. Si los resultados de ambos grupos se juntaran, el porcentaje de la sensibilidad de IDR y FC sería también muy cercano (93.7% y 85.4% a los títulos > 1:4). La sensibilidad del RB fue del 100 %.

De las 77 ovejas libres de brucelosis, ninguna fue positiva en las pruebas de IDR, RB y FC (100% de especificidad en ovinos no expuestos a *Brucella*).

B. Ovinos vacunados (Cuadro 2). Los ovinos vacunados con Rev 1 fueron probados sólo con el HN de *B. melitensis* 16M, ya que las pruebas de FC y RB dieron negativos hasta el cuarto mes posvacunación (Cuadro 2). Cuatro meses después de la vacunación, las pruebas de FC e IDR fueron negativas en las 11 ovejas vacunadas por vía conjuntival. En el mismo tiempo de muestreo, en el grupo de las ovejas vacunadas por vía subcutánea había 11 (FC, título > 1:4) y 2 (IDR) que permanecieron positivas. En los ovinos adultos vacunados por vía conjuntival, a los

**CUADRO 1. RESULTADOS EXPRESADOS EN PORCENTAJE DE LA SENSIBILIDAD DE INMUNODIFUSION RADIAL CON HAPTENOS NATIVOS CON SUEROS DE OVINOS INFECTADOS CON *Brucella melitensis* BIOTIPO 1 y 3.**

	BIOTIPO 1	BIOTIPO 3
HN <i>B. melitensis</i> 16 M	97%	94%
HN <i>B. abortus</i> 2308	59%	79%
HN <i>Y. enterocolitica</i> O:9	35%	69%
Fijación del complemento	89%	85%
Rosa de Bengala	100%	100%

**CUADRO 2. RESULTADOS EXPRESADOS EN PORCENTAJE DE LA ESPECIFICIDAD DE LA PRUEBA DE INMUNODIFUSION RADIAL CON HAPTENOS NATIVOS CON SUE-ROS DE OVINOS VACUNADOS CON REV 1 USANDO DIFERENTES PROTOCOLOS DE VACUNACION, A LOS CUATRO MESES POSVACUNACION.**

PROTOCOLOS DE VACUNACION CON REV 1

	ovejas de 3 a 6 meses vacunadas por vía conjuntival $1 \times 10^9$ UFC	ovejas de 3 a 6 meses vacunadas por vía subcutánea $1 \times 10^9$ UFC	ovejas adultas vacunadas por vía conjuntival $1 \times 10^5$ UFC	ovejas adultas vacunadas por vía subcutánea $1 \times 10^5$ UFC
HN <i>B. melitensis</i> 16 M	100%	82%	91%	82%
HN <i>B. abortus</i> 2308	100%	82%	91%	82%
HN <i>Y. enterocolitica</i> 0:9	100%	82%	91%	82%
Fijación del complemento	100%	0%	91%	64%
Rosa de Bengala	100%	0%	91%	64%

cuatro meses de la vacunación, uno de ellos fue positivo en las pruebas de IDR y FC. En las diez ovejas adultas vacunadas por vía subcutánea, la FC fue positiva en 4, y en otras 2, en la prueba de IDR.

### DISCUSION

En trabajos previos sobre el valor de la IDR con polisacáridos de *Brucella*, como una prueba confirmatoria para el diagnóstico de brucelosis bovina (5,6,7), han demostrado que la vacunación de terneras con la cepa 19, rara vez induce la formación de anticuerpos precipitantes frente a los polisacáridos y que, por el contrario, la infección provoca su aparición. Los resultados de la IDR en el ganado ovino difieren con los obtenidos en el ganado bovino, ya que para obtener una alta sensibilidad, fue necesario emplear tres concentraciones de HN. Desde un punto de vista práctico, es recomendable emplear tres concentraciones de HN (5, 10 y 20  $\mu\text{g/ml}$  con solución amortiguadora de glicina) de *B. melitensis* 16M para el diagnóstico de la brucelosis ovina. En estas condiciones, la sensibilidad alcanzada en ovinos, con infección demostrada bacteriológicamente, fue del 94.6 %. En un trabajo previo, Blasco

y col. (8), demostraron que la cepa *B. melitensis* Rev 1, a dosis  $1 \times 10^9$  ufc empleada como vacuna, induce precipitinas frente a los HN y que el porcentaje de reacciones positivas en la IDR y FC decrecen de forma paralela. Nuestros resultados, sugieren que la IDR tiene mejor especificidad que la FC (2% contra 0%) en animales vacunados subcutáneamente con la dosis estándar y que ambas pruebas son equivalentes en ovinos jóvenes o adultos, vacunados conjuntivamente.

La técnica original para la obtención de HN descrita por Díaz y col. (5) supone el empleo de la cepa *B. melitensis* 16M, que es virulenta. Para evitar este inconveniente, se ha sugerido que la cepa 16M, puede ser reemplazada por la cepa atenuada *B. abortus* (9). Sin embargo, en un estudio anterior (7) se observó que con el empleo del HN crudo de la cepa de *B. abortus*, la sensibilidad fue menor que cuando se utilizó el HN de 16M. En el presente trabajo, queda demostrado que el HN de *B. abortus* es con el que se han obtenido peores resultados; además, los resultados aquí encontrados demuestran que los HN de *B. abortus* y *Y. enterocolitica* 0:9 no son útiles para el diagnóstico de la brucelosis en ovejas.

## RADIAL IMMUNODIFFUSION WITH NATIVE HAPTEN FOR DIAGNOSIS OF *Brucella melitensis* IN SHEEP

### SUMMARY

To determine the sensitivity and specificity of the radial immunodiffusion test (IDR), native hapten (HN) polysaccharides from A and M brucellas and *Yersinia enterocolitica* 0:9, were compared for the diagnosis of *Brucella melitensis* 16M and Rev 1, *B. abortus* 2308 and *Y. enterocolitica* 0:9. Agarose with 10% NaCl was used to prepare the plates for radial immunodiffusion, with borate buffer solution for the *B. abortus* and *Y. enterocolitica* polysaccharides, and with buffered glycine solution for *B. melitensis* native hapten, at three different concentrations. The sera used were from 85 sheep infected with *B. melitensis* biotype 1, from 77 negative sera sheep collected from brucellosis free-areas and 42 sera from sheep vaccinated with different doses and routes of *B. melitensis* Rev 1. The sensitivity of IDR *B. melitensis* HN was 95%, while the sensitivity with *B. abortus* HN was 60%, and with the *Yersinia* HN was 35%. The specificity for the negative sheep in all cases was 100%, and in *B. melitensis* Rev 1 vaccinated sheep varied from 90 to 100%. The homologous 16M *B. melitensis* HN was better for the diagnosis of ovine brucellosis. The high sensitivity and specificity of homologous IDR HN, indicated that IDR is recommended for use in vaccinated animals.

KEY WORDS: Sheep, *Brucella melitensis*, Native hapten.

### REFERENCIAS.

1. Núñez T E, Diaz-Aparicio E, Velázquez Q F. 1995. Presencia de anticuerpos contra *Brucella ovis* y *Brucellas* lisas en sementales ovinos jóvenes. Memorias del VII Congreso Nacional de Producción Ovina. Chapingo, México.
2. Romero M J A, Moreno C B, López MA, Tórtora P J. 1995. Seroprevalencia de brucelosis en ovinos en un modelo de producción campesina en México. Memorias del VII Congreso Nacional de Producción Ovina. Chapingo, México.
3. Asarta A. 1989. Erradicación de la brucelosis en el ganado vacuno de Navarra. Actas del XII Congreso Nacional de Microbiología. Sociedad Española de Microbiología. 1:371-375.
4. Alton G G, Jones L M, Angus R D, Verger J M. 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. INRA, Paris.
5. Díaz R, Toyos J, Salvo M D, Pardo M L. 1981. A simple method for the extraction of polysaccharide B from *Brucella* cells for use in the radial immunodiffusion test diagnosis of bovine brucellosis. Ann. Rech. Vet. 12:35-39.
6. Díaz R, Garatea P, Jones L M, Moriyón I. 1979. Radial immunodiffusion test with a *Brucella* polysaccharide antigen for differentiating infected from vaccinated cattle. J. Clin. Microbiol. 10:37-41.
7. Díaz R, Toyos J, Salvo M D, Fernández-Lago L, Alonso B, Moriyón I, Dorronsoro I. 1984. Studies on the polysaccharide B and native hapten of *Brucella* and *Y. enterocolitica* serotype 9. Develop. Biol. Standard. 56:213-220.
8. Blasco JM, Díaz R, Moriyón I, Salvo M D. 1984. Evaluation of a radial immunodiffusion test for diagnosis brucellosis in sheep and its possible value for differentiating infected from *B. melitensis* Rev. 1, vaccinated sheep. Rev. Develop. Biol. Standard. 56:507-511.
9. Zygmunt MS, Dubray G. 1987. Preparation by ultra-filtration and control by high-performance liquid chromatography of the native hapten of *B. abortus* for use in radial immunodiffusion diagnostic test. J. Clin. Microbiol. 25:1860-1863.