

EVALUACIÓN DE UNA TÉCNICA DE DOBLE DIFUSIÓN EN GEL DE AGAR PARA EL DIAGNOSTICO DE LA INFECCIÓN POR *BRUCELLA OVIS* EN CARNEROS

Carlos A. Robles, MV, M.Sc.

Grupo de Salud Animal, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) CC: 277 (8400) Bariloche,
ARGENTINA. email: robles.carlos@inta.gob.ar

RESUMEN

La brucelosis ovina por *Brucella ovis* es una enfermedad infecto contagiosa de distribución mundial, presente en nuestro país desde 1963. El diagnóstico serológico basado en la inmunodifusión en gel de agar ha sido la técnica mas usada en nuestro país, sin embargo, la sensibilidad del test no es buena y sigue habiendo algunos aspectos prácticos de la técnica que dificultan su ejecución por veterinarios rurales y laboratorios menores. En el presente trabajo se evaluó un gel preparado con búfer tris (pre-set crystals) a pH 8.3. Se obtuvo una sensibilidad del 97.1% cuando se evaluó la prueba con 69 carneros naturalmente infectados con *Brucella ovis* y una especificidad del 100% cuando se la evaluó con 200 sueros de animales provenientes de un establecimiento libre de la enfermedad. Se obtuvo una sensibilidad menor (91.2%) cuando el test se evaluó con 52 sueros de carneros infectados experimentalmente con *Brucella ovis*. También se observó un 39.1% de reacción cruzada cuando se evaluaron 97 sueros provenientes de ovejas infectadas naturalmente con *Brucella melitensis*. De los resultados obtenidos se concluye que el test descrito tiene una sensibilidad comparable o mejor que la Fijación del complemento y a partir de que es fácil su ejecución, podría ser adoptado como prueba tamiz por laboratorios menores para el diagnóstico de la infección por *Brucella ovis* a nivel de establecimiento.

Palabras clave: ovinos, Brucelosis, *Brucella ovis*, reproducción, enfermedad

EVALUATION OF AN AGAR GEL DIFUSSION TEST FOR THE DIAGNOSIS OF *BRUCELLA OVIS* INFECTION IN RAMS

SUMMARY

Sheep Brucellosis due to *Brucella ovis* is a contagious infectious disease world-wide distributed. The serological diagnosis based on the agar gel immunodiffusion test has been the most used test in our country, since 1963 when it was first reported. However, its sensitivity is not good enough and some inconvenience on performing the test, has made it not available in clinics and minor laboratories. During the present study we evaluated a new gel prepared with tris buffer using Tris pre-set crystals, pH 8.3. A sensitivity of 97.1% was obtained when the test was evaluated with sera from 69 rams naturally infected with *Brucella ovis* and a specificity of 100% when evaluated with 200 sera from rams belonging to a farm free of the disease. A minor sensitivity (91.2%) was found when the test was evaluated with 52 sera from rams experimentally infected with *Brucella ovis*. Cross reaction was observed in 39.1% of 97 sera belonging to sheep infected naturally with *Brucella melitensis*. From the results obtained it is concluded that the test has a sensitivity comparable or better than the Complement fixation test and since it is easy to perform is feasible to be adopted by minor laboratories and clinics as a screening test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection at flock level.

Keywords: sheep, Brucellosis, *Brucella ovis*, reproduction, disease.

INTRODUCCIÓN

La Brucelosis ovina por *Brucella ovis* es una enfermedad infecto-contagiosa de distribución mundial (Burgess, 1982; Blasco, 1990; FAO, 1992) cuyo signo más visible es la epididimitis en carneros y ocasionalmente aborto en hembras gestantes (Kennedy y col, 1956; Biberstein y col, 1964; Meinershagen y col, 1974).

La brucelosis ovina en nuestro país está ampliamente difundida en la Mesopotamia, Patagonia y Pampa húmeda, con prevalencias que varían entre un 4% y un 37% en establecimientos infectados (Myers 1973; Draghi y col, 1984; Robles y col, 1990; Paolicchi y col, 1992; Robles y col, 1993).

El diagnóstico serológico basado en la inmunodifusión en geles de agar (Myers & Siniuk, 1970) ha demostrado una sensibilidad y especificidad semejante a la fijación del complemento, con la ventaja de un menor costo y ser mucho más sencilla de realizar que ésta (Myers, 1973; Moro, 1974; Marin y col, 1989; Blasco 1990). Esto la convierte en la única técnica disponible para laboratorios pequeños y por ende la única pasible de ser transferida al veterinario privado que quiera incorporar la serología de *Brucella ovis* a la ya tradicional revisión clínica de los carneros.

Sin embargo las técnicas de gel difusión en uso, aun siguen siendo de cierta complejidad para el veterinario privado sobre todo en lo que hace a la obtención de los geles ya que es necesario preparar una solución búfer para lo cual es necesario contar como mínimo con un pechímetro.

En el presente trabajo se presentan los resultados logrados con una técnica de gel difusión de fácil ejecución, usando un antígeno obtenido por extracción salina en caliente de una cepa de *Brucella ovis*, y usando Tris como sustancia búfer.

EXPERIMENTO 1: Comparación de un gel tris con respecto a otros geles de referencia

MATERIALES Y MÉTODOS

Antígeno: Se utilizó un extracto salino en caliente obtenido a partir de la cepa REO 198 de *B. ovis*. Dicha sepa se cultivó en caldo tripticasa-soya con 5% de suero de ternera a 37°C por 48 horas. Las células obtenidas se lavaron, se autoclavaron por 20 minutos y posteriormente fueron centrifugadas a 12000 x g por 30 minutos. El sobrenadante obtenido fue ultracentrifugado a 130.000 x g a 4°C y el pellet resultante fue resuspendido en agua destilada y liofilizado. El antígeno así obtenido, evaluado por las técnicas estándares de SDS-PAGE y Lowry, demostró ser rico en lipopolisacárido rugoso y proteínas de membrana. La dilución de uso fue fijada en 15 mg/ml.

Sueros: Se utilizaron 15 sueros provenientes de animales naturalmente infectados con *B. ovis* y 15 sueros negativos obtenidos de animales provenientes de un establecimiento libre de brucelosis.

Geles: Como base se utilizó en todos los casos Agar noble Oxoid adicionado de una solución de Azida de sodio al 0.1 % para inhibir el crecimiento de flora contaminante. Se ensayaron 3 tipos distintos de geles y cada uno de ellos a pH de 5, 7.2 y 8.3. Una vez preparados fueron guardados en frascos estériles de 50 ml en heladera a 4°C hasta su uso.

Gel A: Se preparó siguiendo las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud-OMS (Alton y col., 1988) usando un búfer de borato: [1.86 gr. H_3BO_3 + 7.25 gr. KCl + H_2O destilada hasta 1 litro] y un gel compuesto por 0.8 gr. de agar noble en 5 ml de búfer borato y 95 ml de una solución de ClNa al 5%.

Gel B: Se preparó siguiendo las recomendaciones del Centro Panamericano de Zoonosis-CEPANZO (1981) usando un búfer fosfato: [92 ml de Sol. ClNa al 5% + 8 ml Sol. de Sorensen] y un gel compuesto por 1 gr. de agar noble + 100 ml de búfer salino.

Gel C: El búfer se preparó usando Trizma base (Sigma) en solución 0.05 M y el gel compuesto por 1 gr. de agar noble + 10 gr. de Cloruro de sodio + 100 ml búfer tris.

Preparación de los geles: Las diferentes preparaciones de geles se colocaron a Baño maría hasta su licuefacción y con pipeta calibrada se colocaron 3.6 ml de la preparación líquida sobre portaobjetos comunes de vidrio. Tras solidificarse, se llevaron a heladera a 4°C por 1 hora, tras lo cual, usando un sacabocados hexagonal con un orificio central y 6 periféricos se procedió a perforar el agar a razón de 2 rosetas por portaobjeto. Cada pocillo tiene un diámetro de 4mm y los pocillos entre si están a una distancia también de 4 mm.

Siembra del antígeno y de los sueros: En cada roseta se colocó el antígeno en el pocillo central y los sueros a evaluar en los pocillos periféricos. Tanto el antígeno como los sueros se sembraron a razón de 30 microlitros por pocillo.

Cada portaobjeto con las muestras sembradas se colocó en una caja de petri. Al costado del portaobjeto se colocó un algodón humedecido en agua para evitar la deshidratación del gel. Se tapó la caja de petri y se mantuvieron las cajas a temperatura ambiente (aproximadamente a 18°C).

Interpretación de los resultados de la prueba: Las lecturas de la prueba se hicieron a las 24, 48, 72 y 96 horas. La formación de una banda de precipitación entre el antígeno y el suero se consideró como reacción positiva y la ausencia de banda como resultado negativo.

RESULTADOS

La especificidad fue del 100% para los tres tipos de geles, en cualquiera de los pH evaluados.

En varios casos se logró una sensibilidad del 100% como se puede apreciar en la Tabla 1.

Tabla 1: Sensibilidad de los 2 geles de referencia y del gel tris, a 3 pH distintos, evaluados con 15 sueros positivos y con lectura de los resultados a las 24, 48, 72 y 96 horas.

	pH	24 horas	48 horas	72 horas	96 Horas
Gel A (OMS)	8.3	53.3	80	100	93.3
	7.2	66.6	93.3	93.3	93.3
	5	66.6	93.3	93.3	86.6
Gel B (CEPANZO)	8.3	73.3	86.6	93.3	100
	7.2	60	93.3	100	100
	5	53.3	93.3	93.3	93.3
Gel C (TRIS)	8.3	66.6	93.3	100	100
	7.2	33.3	93.3	93.3	100
	5	46.6	93.3	93.3	93.3

EXPERIMENTO 2: Evaluación de un gel tris 0.05 M a pH 8.3

MATERIALES Y METODOS

Antígeno: Se usó el mismo antígeno que para el experimento N° 1.

Preparación del gel: En base a los resultados del experimento 1 se decidió evaluar la formulación del gel con un búfer tris 0.05M a pH 8.3, con lectura a las 72 horas, reemplazando el Trizma base usado inicialmente por una formulación de Tris pre-set crystals, pH 8.3 (Sigma) a fin de obviar el ajuste del pH. El gel se preparó de la siguiente manera:

Tris pre-set crystals pH 8.3	0.67 gr.
CINa	10 gr.
Agar noble	1 gr.
Azida de sodio	0.1 gr.
Agua destilada	100 ml

Se pesaron y mezclaron todos los componentes de una sola vez y se llevó a Baño maría hasta lograr una solución transparente. Se procedió como en el experimento N° 1 para guardar alicuotado el gel en heladera y posteriormente hacer las placas y perforar las rosetas.

Sueros utilizados

Grupo 1: 69 sueros positivos de carneros naturalmente infectados y con aislamiento positivo de *B.ovis* de semen.

Grupo 2: 57 sueros positivos de carneros experimentalmente infectados con *B.ovis*.

Grupo 3: 200 sueros de ovinos provenientes de un establecimiento libre de *B.ovis* y *Brucella melitensis*.

Grupo 4: 97 sueros de ovinos infectados naturalmente con *B.melitensis* y con aislamiento positivo, pero negativos a *B.ovis*.

Cálculo de sensibilidad, especificidad y valores predictivos: Para el cálculo de estos parámetros se usó el programa Win-Episcope, Ver 1.0 (K. Frankena y col., Wageningen, The Netherlands & Zaragoza, Spain).

La sensibilidad se definió como la habilidad que tiene una técnica para identificar correctamente animales enfermos como positivos y la especificidad se definió como la habilidad que tiene una técnica para identificar correctamente animales sanos como negativos.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos con los sueros positivos provenientes de carneros naturalmente infectados (grupo 1) y con los sueros negativos provenientes de carneros de establecimientos libres de la enfermedad (grupo 3) se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2: Sensibilidad, especificidad y valores predictivos del gel tris, pre-set crystals, pH 8.3, calculados con un 95% de confianza.

	Valor	Límite inferior	Límite superior
Sensibilidad	97.10	93.14	101.06
Especificidad	100	100	100
Valor predictivo (+)	100	100	100
Valor predictivo (-)	99.01	97.64	100.38

Los resultados obtenidos con los 57 sueros de carneros infectados experimentalmente con *B. ovis* (grupo 2) y con los 97 sueros provenientes de ovinos naturalmente infectados con *Brucella melitensis* pero negativos a *B. ovis* (grupo 4) se pueden apreciar en la Tabla 3.

Tabla 3: Evaluación del gel Tris pre-set crystals, pH 8.3, con sueros de carneros experimentalmente infectados con *B. ovis* y con sueros de ovejas naturalmente infectadas con *B. melitensis*.

Tipo de suero	Positivos		Negativos	
	Nº	%	Nº	%
Grupo 2: 57 (+) exp. infect. <i>B. ovis</i>	52	91.23	5	8.77
Grupo 4: 97 (+) nat. infect. <i>B. melitensis</i>	38	39.17	59	60.83

DISCUSION

El diagnóstico de la Brucelosis ovina se realiza generalmente a través de pruebas serológicas, siendo las más usadas la Fijación del complemento, la Inmunodifusión en gel de agar y el ELISA. A partir de que tanto la Fijación del complemento como el ELISA requieren de equipamiento especial y un buen entrenamiento del operador, la Inmunodifusión en gel de agar es la prueba que más posibilidades tiene de ser usada en laboratorios menores.

El test que hemos evaluado, basado en un gel de agar noble, con 10% de Cloruro de Sodio y un búfer tris 0.05M pH 8.3 demostró una muy buena sensibilidad (97.1%) igualando o superando lo hallado por otros autores usando geles formulados en base a búferes borato, fosfatos, glicina, etc. (Marin y col, 1989; Myers y Siniuk, 1970; Worthington y col, 1984; Worthington y col, 1985; Jones y col, 1975; Myers, 1973).

Asimismo, es interesante mencionar que la sensibilidad del 97.1 obtenida con este test, es comparable a la sensibilidad de la Fijación del Complemento y del ELISA reportado en otros trabajos (Worthington y col, 1984; Marin y col, 1989; Robles y col, 1993).

La especificidad fue del 100%, lo que también es común a otras formulaciones de geles evaluadas por otros autores (Myers y Siniuk, 1970; Jones y col, 1975; Marin y col, 1989; Blasco, 1990).

Las distintas técnicas de gel difusión para *B. ovís* reportadas hasta el momento hacen uso de búferes borato, fosfatos, glicina, etc., que requieren preparar primero la solución búfer y luego el gel, y contar además con un peachímetro para poder llevar la solución búfer al pH deseado. El uso del Tris con pH prefijado, introduce una ventaja importante sobre las demás formulaciones usadas, dado que ajusta automáticamente el pH del preparado, lo que permitiría el uso de esta técnica en laboratorios menores que no cuentan con peachímetro y es mas sencilla de preparar, ya que se pesan los componentes, se mezclan todos juntos de una vez y se lleva a baño maría hasta que el gel esté transparente.

La buena sensibilidad y especificidad lograda con el antígeno descrito y el alto rendimiento logrado en su producción, sugieren que este tipo de antígeno es el adecuado para usar en pruebas de inmunodifusión en geles de agar.

El gel guardado en frascos de 50 ml. se mantuvo bien en heladera por el término de 2 meses. Esto es de importancia práctica, ya que permitiría preparar al comienzo de la temporada reproductiva todo el gel a usar durante la misma.

De lo expuesto se concluye que esta técnica de gel difusión para el diagnóstico de infección por *B. ovís* en carneros produce resultados confiables y puede ser utilizada por los veterinarios rurales ya sea para el diagnóstico de la brucelosis en majadas como para el desarrollo de programas de control de la brucelosis a nivel de establecimiento.

AGRADECIMIENTOS: Al Profesor Ignacio Moriyón (Universidad de Navarra, ESPAÑA) por sus consejos en la producción del antígeno y al Dr. José Maria Blasco (Servicio de Investigaciones Ganaderas, Zaragoza, ESPAÑA) por facilitarme algunos de los sueros que fueron usados en este estudio.

REFERENCIAS

- Alton, G G; Jones, L M; Angus, R D; Verger, J M (1988) Ed. INRA, Paris, France, pp 190.
- Biberstein, E L; McGowan, B; Olander, H; Kennedy, P C (1964) Cornell Veterinarian, **54** :27-41.
- Blasco, J M (1990) Ed. por Nielsen & Duncan. Boca Raton, Florida, USA, pp:453.
- Burgess, G W; McDonald, J W; Norris, M J (1982). Australian Veterinary Journal, **59** :45-47.
- Centro Panamericano de Zoonosis (CEPANZO). Nota técnica N° 20, 1981, Ramos Mejía, Argentina. 15 p.
- Dragui, M G; Zurbriggen M A; Rochinotti, D; Vanzini, V R; Homse, A C; Baez Kohn, A R (1984). Veterinaria Argentina, **1** :39-43.
- FAO (1992) Animal Health Yearbook. Animal production and health series. N° 32, pp: 271. Ed. FAO/OIE/WHO.
- Hughes, K.L.; Claxton, P.D. (1968) Australian Veterinary Journal, **44** :41-47.
- Jones, L.M.; Dubray, G.; Marly, J. (1975) Annual Recherche Veterinaire, **6** :11-22.
- Kennedy, P C; Frazier, L M; McGowan, B (1956) Cornell Veterinarian, **46** :303-319.
- Marin, C. M.; Jimenez de bagues, M.P.; Blasco, J.M.; Gamazo, C.; Moriyon, I.; Diaz, R. (1989) The Veterinary Record, **125** :504-508.
- Meinershagen, W A; Frank, F W; Waldhalm, D G (1974) American Journal of Veterinary Research, **35** :723-724.
- Moro, M S (1974) Centro Panamericano de Zoonosis, OPS/WHO. Ramos Mejia, Argentina.
- Myers, D.M. y Siniuk, A.A. (1970) Applied Microbiology, **19** :335-337.
- Myers, D.M. (1973) Applied Microbiology, **26** :855-857.
- Paolicchi, F.A., J. Bartolome, A. Patitucci, C. Solanet, and C.M. Campero (1992). Revista de Medicina Veterinaria, Buenos Aires, **73** :46-52.
- Robles, C.A.; Uzal, F.A.; Urcullú, J (1990) Proceedings of the IFS/IAEA/FAO Workshop on Animal disease diagnostics in Latin America. 22 Oct-2 Nov, 1990 , San Jose, COSTA RICA.

Robles, C.A. (1993) Final Report. International Foundation for Sciences (IFS), Sweden.

Robles, C A; La Torraca, A; Sancholuz, M; Uzal, F A; Evans, E (1993) Veterinaria Argentina, **10** :458-461.

Rothwell, J.T., J.E. Searson, I.J. Links, and J.R.W. Glastonbury (1986) Australian Veterinary Journal, **63** :209-211.

West, D M; Bruere, A N (1979) New Zealand Veterinary Journal, **27** :263-265.

Worthington y Cordes (1981) New Zealand Veterinary Journal, **29** : 63.

Worthington, R.W.; Weddell, W.; Penrose, M.E. (1984) New Zealand Veterinary Journal, **32** :58-60.

Worthington, R.W.; Stevenson, B.J.; De Lisle, G.W. (1985) New Zealand Veterinary Journal, **33** :84-86.