

Informe final de beca de entrenamiento

Becaria: Sabbatini, María Amalia

Director: M.V., Dra. Estein, Silvia Marcela

Institución: Facultad de Ciencias Veterinarias -U.N.C.P.BA

Área: Laboratorio de Inmunología. Departamento SAMP. Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN-CONICET-CIC)

Título del proyecto presentado: Técnicas serológicas aplicadas al diagnóstico de infecciones por cepas rugosas de *Brucella*.

Esta beca de entrenamiento estuvo contenida dentro del ensayo: “Evaluación de la interferencia serológica en el diagnóstico de la Brucelosis ovina”.

El objetivo del ensayo fue evaluar la interferencia serológica que generan distintas especies bacterianas en el diagnóstico de la brucelosis por *Brucella ovis* en el modelo ratón. Con este propósito, formulamos en el laboratorio, vacunas inactivadas con las bacterias de interés. Posteriormente, los ratones fueron inmunizados con dichas vacunas y luego se realizaron extracciones de sangre para analizar las muestras en diferentes pruebas serológicas utilizadas para el diagnóstico de brucelosis por especies lisas (*Brucella melitensis*) o rugosas (*Brucella ovis*).

Este análisis serológico se basa en las reacciones cruzadas que pueden existir entre microorganismos de distintos géneros.

Materiales y métodos:

Animales

Se emplearon 54 ratones BALB/c, de 8 semanas de edad. Fueron distribuidos al azar en nueve grupos de experimentación conformados por seis ratones cada uno, los cuales permanecieron, en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias bajo condiciones de luz y temperatura controladas, con agua y alimentación ad libitum.

Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas en la preparación de las vacunas fueron: *Brucella ovis*, *Brucella melitensis*, *Histophilus somni*, *Actinobacillus seminis*, *Mannheimia haemolytica*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Trueperella pyogenes*, *Ochrobactrum anthropi* y *Campylobacter fetus fetus*.

Se realizó el crecimiento y la multiplicación de las cepas bacterianas en medio de cultivo Agar Columbia enriquecido con un 10% de sangre. El medio se preparó en agua destilada de acuerdo a las indicaciones del envase. Luego se prepararon picos de flauta y tubos con 15 ml del mismo para placas de Petri. Los tubos se autoclavaron al igual que las Placas de Petri. Al finalizar el proceso de autoclavado, se prepararon las placas en un ambiente propicio junto al mechero y bajo condiciones extremas de esterilidad. Primero se colocó en cada placa los 15 ml de agar para luego adicionar 1,5 ml de sangre estéril bovina.

Luego de que los picos y placas fueron controlados en estufa, se prosiguió a la siembra de las cepas, para luego dejarlas incubando según los requerimientos de cada bacteria:

- *Histophilus somni*, *Mannheimia haemolytica*, *Corynebacterium pseudotuberculosis* y *Trueperella pyogenes* se incubaron a 37 ° C durante 48 horas.
- *Brucella ovis* se incubó 37° C durante 72 horas con adición de CO₂.
- *Brucella melitensis* y *Actinobacillus seminis* se incubaron a 37°C durante 72 horas.
- *Ochrobactrum anthropi* se incubó a 28° C durante 48 horas.
- *Campylobacter fetus fetus* se incubó a 37° C durante 72 horas, en jarra con una atmósfera de microaerofilia.

Al cumplirse el tiempo estipulado de incubación, se observó el desarrollo y morfología de colonias con una lupa y se realizaron extendidos en portaobjetos para observar morfología bacteriana, con el objetivo de poder controlar que el crecimiento coincida con la especie bacteriana cultivada, como también corroborar que no existan contaminantes en el medio. A continuación realizamos, a partir de cada placa, repiques en picos de flauta, los cuales dejamos incubando para su crecimiento con los requerimientos de cada bacteria, con el fin de obtener un cultivo puro con alta concentración bacteriana.

Suspensiones bacterianas

Se realizaron las suspensiones bacterianas necesarias para la producción de las vacunas. Para su preparación se tuvo en cuenta que por animal se utilizarían 0,6 ml de solución para realizar las tres inmunizaciones y que en total por grupo se utilizaría aproximadamente 10 ml. De esta forma se prepararon dos tubos tapa rosca, de 5 ml por grupo. Las suspensiones se formularon con formol al 1%, solución fisiológica estéril y la concentración bacteriana ajustada de acuerdo al tubo 3 de la escala de Mc Farland. Para llegar a la concentración requerida, tuvimos en cuenta trabajar con material estéril cerca del mechero y con la vestimenta adecuada (barbijo, guantes y guardapolvo) para extremar las medidas de esterilidad y seguridad. Para su inactivación fueron sometidas a un tratamiento térmico (60°C, 30 min), excepto *Brucella* y *Corynebacterium pseudotuberculosis* que se inactivaron a 80°C durante 30 minutos. Luego se sembraron todas las suspensiones en placa, procediendo a su incubación bajo las condiciones requeridas para cada bacteria para comprobar la ausencia de crecimiento y asegurarnos que todos los grupos bacterianos hayan sido inactivados correctamente. El objetivo de la realización de vacunas inactivadas es estimular el sistema inmunitario sin efecto patógeno en los ratones.

Vacunas

Se prepararon nueve vacunas, cada una conformada con una cepa bacteriana. Para la preparación de las vacunas se utilizaron los siguientes materiales: Marcol 52 [3,15 ml]; Arlacel [0.35 ml]; Tween [80: 0.07 ml]; Suspensiones bacterianas [1.45 ml]. El procedimiento consistió en agregar en tubos estériles el Marcol 52 junto con el Arlacel y, por otro lado, el Tween 80 junto a la suspensión y vortexear ambas mezclas por separado. Para terminar, ambas soluciones se mezclaron en un mismo tubo estéril y nuevamente se utilizó el vórtex para homogeneizar el preparado durante aproximadamente tres minutos. El Marcol es un aceite refinado que se utiliza para evitar reacciones indeseables. El Arlacel y el Tween 80 son agentes emulsionantes que se utilizan para estabilizar la emulsión mediante la disminución de la tensión superficial, ayudan a que las dos fases entren en contacto. Las vacunas obtenidas se conservaron hasta su uso bajo refrigeración.

Pruebas Serológicas para detección anticuerpos contra especies lisas de Brucella spp.

BPA (Aglutinación con antígeno tamponado en placa)

Esta prueba serológica detecta anticuerpos IgG1 anti- brucella lisa. Estos últimos demuestran la presencia de una infección activa. Para su ejecución se empleó el protocolo oficial descrito por la OIE, modificándose el volumen de los reactivos por la pequeña cantidad de suero disponible. De esta forma se utilizaron 12 µl de antígeno BPA (antígeno ácido amortiguado certificado por SENASA, otorgado por Laboratorio Biológico Tandil[®]) y 32 µl de suero. Previo acondicionamiento de ambos reactivos a temperatura ambiente, el antígeno BPA se homogeneizó mezclándolo suavemente durante algunos minutos. En el laboratorio contamos con un aglutinoscopio, sobre el cual se colocó una placa de vidrio, en la que se depositaron con micropipeta automática las cantidades estipuladas de suero y de antígeno. Se tuvo la precaución de utilizar “tips” individuales para cada muestra de suero, evitando así su contaminación. Ya depositados los reactivos sobre la placa, se homogeneizaron con mezclador de acrílico en forma circular y con movimientos rotativos en forma manual. Realizado este procedimiento, se tapó el aglutinoscopio, permaneciendo con luz apagada durante 5 minutos. Culminados éstos, se realizó una nueva homogenización igual a la nombrada anteriormente. Pasados 8 minutos, rotando nuevamente la placa y con luz encendida, se realizó la lectura. Esta última se efectuó a simple vista y la presencia de grumos se interpretó como una reacción positiva. Contrariamente, cuando se visualizó una turbidez homogénea pero sin presencia de grumos, se consideró un resultado negativo.

Pruebas Serológicas para detección anticuerpos contra especies lisas de Brucella spp.

IDGA (Inmunodifusión en gel de agar)

Para esta prueba fue necesaria la preparación de un gel de agar a base de una solución de agar noble en un Buffer borato pH 8,3. Para su preparación se utilizan los siguientes reactivos: Agar Noble [1g], cloruro sódico [10g], y tampón borato (preparado con ácido bórico [1,45 g]; cloruro potásico [1.45 g]; agua destilada [200 ml]; ajustado a pH 8,3 con una solución de NaOH 0,02 M).

Depositados todos nuestros reactivos en un erlenmeyer, se fundió la preparación en baño María. Se depositaron 15 ml de solución por placa, dejándolas enfriar a temperatura ambiente hasta su solidificación. Luego, se procedió a perforar las mismas con un sacabocado en forma de rosetas, dispuestas con un patrón hexagonal, alrededor de un pocillo central. Los sueros a examinar se ubicaron en pocillos alternativos, separados por un suero control positivo a *Brucella ovis* (infección demostrada mediante bacteriología). En el pocillo central se colocó el antígeno (HS ;extracto salino de *B. ovis*) diluido en agua destilada. Los resultados se examinaron después de una incubación de 72 horas a temperatura ambiente, en una cámara húmeda (caja de telgopor con varios papeles embebidos en agua). Se consideró positiva la presencia de una línea de precipitado definida entre el pocillo central y los pocillos de los sueros problema, que demostró una identidad total con la del control positivo.

RSAT (Aglutinación rápida en placa con Ag B. canis (M-))

Para esta prueba se utilizó el mismo aglutinoscopio con placa de vidrio descrito para el BPA. El antígeno utilizado fue el RSAT (elaborado por el Laboratorio de Inmunología). Se emplearon

10 µl de suero y el mismo volumen de Ag. Una vez depositados ambos reactivos sobre la placa de vidrio, se mezcló con un mezclador de acrílico y se rotó la placa en forma manual. Luego, se tapó el aglutinoscopio, conservándose con luz apagada por dos minutos. Transcurrido el tiempo, se realizó la lectura a simple vista con luz encendida. Se consideraron positivas aquellas reacciones con presencia de grumos, mientras que las que contaron con turbidez, sin la evidencia de grumos, se interpretaron como negativas.

Diseño experimental

Los ratones (n= 54) fueron distribuidos en 9 grupos (G), compuestos por 6 ratones dispuestos al azar. Cada ratón fue inmunizado con la vacuna correspondiente a su grupo. Las bacterias elegidas para la formulación de éstas y la conformación de los grupos, fueron: G1: *Brucella ovis*; G2: *Brucella melitensis*; G3: *Actinobacillus seminis*; G4: *Campilobacter fetus fetus*; G5: *Corynebacterium pseudotuberculosis*; G6: *Histophilus somni*; G7: *Mannheimia haemolytica*; G8: *Ochrobactrum anthropi*; G9: *Trueperella pyogenes*. Las inmunizaciones se realizaron los días 0, 21, 42 y las extracciones de sangre los días 30,60 y 90.

Inmunizaciones

Se realizó una inmovilización física de los ratones, tomándolos de la cola con el dedo meñique y con el dedo pulgar e índice del pliegue suelto de la nuca, para aplicar en este mismo, 0,2 ml de la vacuna vía subcutánea.

Extracción de sangre y obtención de suero

Previo anestesia de los ratones se extrajo sangre del espacio retroorbital por punción. Estas muestras fueron depositadas en viales, sin anticoagulante, a los efectos de obtener el suero. Las muestras fueron conservadas bajo refrigeración a -20°C hasta su procesamiento. A la hora de utilizar las muestras, éstas se colocaron en estufa a 37°C por una hora y media, donde se presentan las condiciones necesarias para obtener el suero. Cumplido el tiempo, se colocaron en la centrifugadora, a una temperatura de 25°C y 2500 rpm (revoluciones por minuto), durante 10 minutos. Al finalizar el centrifugado, se extrajo el suero con la ayuda de una pipeta, para colocarlo en viales nuevos hasta su posterior análisis mediante las técnicas de BPA, IDGA y RSAT.

Resultados

Durante el ensayo murieron ocho ratones por peleas inevitables entre machos. Por esta razón los grupos 1 y 6 quedaron conformados por cinco ratones, mientras que los grupos 2 y 9 por cuatro y dos, respectivamente. Analizando detenidamente los resultados (Tabla 1), podemos observar que el BPA resultó tener una sensibilidad del 100% para el diagnóstico de *Brucella melitensis*, a pesar de arrojar porcentajes relevantes de falsos positivos en los grupos restantes. De la misma forma, pudimos comprobar que a partir del día 60 post-vacunación, la prueba RSAT, tuvo un 100% de eficacia en el diagnóstico de *Brucella ovis*, aunque detectó porcentajes importantes de falsos positivos. El motivo de la falta de reactores positivos a los treinta días para *Brucella ovis*,

creemos que fue el déficit de una concentración detectable de anticuerpos en sangre. Con respecto al análisis de las muestras con la IDGA, sólo se detectó el mayor % de reactores positivos (40%) en el grupo inmunizado con *B. ovis* inactivada.

Tabla 1. Número y porcentajes de sueros positivos a las pruebas de BPA, RSAT e IDGA a los días 30, 60 y 90 días post-vacunación.

Grupos	Días Post-Vacunación			% Reactores Positivos		
	30	60	90	BPA	RSAT	IDGA
<i>Brucella ovis</i>	0	0	0	0%	66,66%	40,00%
	0	5	5			
	0	3	3			
<i>Brucella melitensis</i>	4	4	4	100%	41,66%	0%
	0	2	3			
	0	0	0			
<i>Actinobacillus seminis</i>	0	0	0	0%	0%	0%
	0	0	0			
	0	0	0			
<i>Campylobacter fetus</i>	0	2	2	22,22%	16,66%	5,55%
	0	2	1			
	0	1	0			
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	0	0	0	0%	5,55%	0%
	0	0	1			
	0	0	0			
<i>Histophilus somni</i>	0	2	2	26,66%	13,33%	0%
	0	2	0			
	0	0	0			
<i>Manheimia haemolytica</i>	0	4	4	44,44%	66,66%	11,11%
	0	6	6			
	0	1	1			
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	0	0	0	0%	50%	11,11%
	0	4	5			
	0	1	1			
<i>Trueperella pyogenes</i>	0	0	0	0%	0%	0%
	0	0	0			
	0	0	0			

Conclusión

Por último, se puede apreciar en los valores de la Tabla 1, que siete de las 9 vacunas inactivadas indujeron la producción de anticuerpos que generaron reacciones cruzadas, quedando así demostrada, la existencia de interferencia serológica en el diagnóstico de Brucelosis ovina.

Tareas adicionales o complementarias

Paralelamente a mi trabajo en el laboratorio de inmunología, tuve la oportunidad de participar en diferentes actividades del área de microbiología. Esto me permitió interiorizarme en los aspectos bacteriológicos de *Brucella*, particularmente de las especies rugosas, sobre las cuales estuvo enfocada mi beca. Durante todo este periodo realicé las actividades necesarias para llevar a cabo la marcha bacteriológica a partir de muestras clínicas. En las distintas etapas de trabajo, con el fin de aprender cada uno de los pasos en los que consistía el procesamiento de una muestra, se desarrollaron determinadas actividades con cepas bacterianas procedentes del mismo laboratorio, mientras que en otras oportunidades, se utilizaban muestras clínicas que llegaban del exterior y eran procesadas allí, donde pude desempeñarme como ayudante.

Actividades desarrolladas en el Laboratorio de Bacteriología

- Comportamiento higiénico y medidas de seguridad dentro del laboratorio: *Brucella spp.* es una bacteria de alto riesgo de infección en los seres humanos, por lo tanto, mi aprendizaje, se sostuvo en el adecuado manejo de materiales infecciosos, con el propósito de reducir al mínimo la exposición a estos agentes potencialmente peligrosos. Con el mismo fin, realicé todas las técnicas de acondicionamiento, empaquetado, esterilización y autoclavado del material de laboratorio, necesarias para contribuir a esta seguridad biológica.
- Aprendizaje de técnica de frotis y uso del microscopio óptico: En lo que respecta a la marcha bacteriológica que mencioné en un principio, lo primero que estudié, fueron las diferentes morfologías bacterianas existentes. En el laboratorio se encontraban disponibles gran variedad de frotis, los cuales observamos durante varios días, con el objetivo de poder identificar microscópicamente las diferentes bacterias, conocer todas las variedades existentes y poder dominar el uso del microscopio óptico. Terminado este trabajo, nos centramos en *Brucella*, y en el aprendizaje de la técnica para realizar un frotis, como también la coloración de Gram para el examen bacteriano en fresco. La coloración de Gram, nos permite diferenciar aquellas bacterias Gram positivas, teñidas de un color violáceo, de aquellas Gram negativas, teñidas de color rosa. En el caso de *Brucella spp.*, se observaban rosadas.
- Siembra de bacterias en placa: Luego de poder identificar la bacteria microscópicamente, pasamos a realizar diferentes técnicas de siembra en medio primario (placa de Petri). Previamente, se acondicionaban los medios de cultivo necesarios para el crecimiento de *Brucella*. Agar *Brucella* fue el más utilizado (aunque contábamos con otros medios optativos) y, en algunos casos, se le adicionaba un 10% de sangre para hacerlo más nutritivo y ayudar a su crecimiento.

- *Incubación de placas:*
La incubación de las placas puede realizarse en aerobiosis, microaerofilia y anaerobiosis. En el caso de *Brucella canis*, le aportábamos una temperatura de 37° C, entre 7 y 10 días. Por otro lado, *Brucella ovis* requería un tiempo de incubación más corto y la adición de CO₂ necesario para su desarrollo (estufa de CO₂).
- *Estudio y descripción de colonias:*
Al finalizar el periodo de incubación, examinamos las colonias con ayuda de una lupa especial, describiendo su color, bordes, consistencia, tamaño, forma, etc.
- *Verificación de morfologías bacterias:*
Una vez visualizadas las colonias, era necesario, verificar que estas estaban formadas por la bacteria que nosotros habíamos sembrado. Para esto retomamos la realización de los frotis y la coloración de Gram.
- *Obtención de cultivos puros en medios sólidos:*
Terminada la observación de la morfología en el microscopio óptico, confirmamos la presencia de un cocobacilo Gram negativo, correspondiente a nuestro género. De este modo, se recolectó con ansa el crecimiento de la placa y realizamos cultivos puros en picos de flauta con técnicas de estriación (técnica de siembra).
- *Estudios bioquímicos:*
En última instancia realicé estudios bioquímicos para determinar género y especie bacteriana. Las más desarrolladas fueron: ureasa, catalasa, oxidasa, indol, glucosa-nitrato, producción de ácido sulfhídrico, reducción del nitrato y oxidación-fermentación. Estas pruebas son las descriptas para la identificación de *Brucella*.

Reflexión personal

La beca de entrenamiento me permitió conocer que existen numerosas tareas de investigación en la Facultad, desarrolladas tanto por becarios y docentes como por investigadores de otras instituciones que tienen como lugar de trabajo nuestra Universidad. Asimismo, apreciar que la profesión de veterinario no se circunscribe solamente a la atención de animales en la clínica, sino también, en la generación de nuevos conocimientos a través de la investigación. Este año, en los Laboratorios de Inmunología y Microbiología, me permitió adquirir las herramientas necesarias para iniciarme y, en un futuro, perfeccionarme como investigadora.