

PRODUCCIÓN DE ANTÍGENOS Y ANTICUERPOS PARA LA INVESTIGACIÓN DE *Corynebacterium kutscheri* Y *Bordetella bronchiseptica* EN ANIMALES DE LABORATORIO MEDIANTE LA TÉCNICA DE MICROAGLUTINACIÓN DIRECTA EN PLACA

JM Laborde, P Cagliada, C Carbone

Cátedra de Animales de Laboratorio y Bioterio.
Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

RESUMEN: Una de las técnicas que se utilizan para la detección de infecciones en animales de experimentación es la microaglutinación directa en placa. El objeto de este trabajo fue producir antígenos y anticuerpos para el diagnóstico de *Corynebacterium kutscheri* y *Bordetella bronchiseptica*, las cuales deben estar ausentes en ratas y ratones de laboratorio. Las cepas bacterianas de *Corynebacterium kutscheri* SL5 y *Bordetella bronchiseptica*, (NIH Japón) se cultivaron en medios bacteriológicos específicos. Se obtuvo una dilución de $1,5 \times 10^9$ UFC/ml (turbidez aproximada al tubo número 5 de la escala de Mac Farland) para *C. kutscheri* y una dilución de $2,1 \times 10^9$ UFC/ml (turbidez aproximada al tubo número 7) para *B. bronchiseptica*. Los antígenos producidos a partir del cultivo bacteriano se inocularon en conejos mediante un programa de inmunización para la producción de antisueros. Los títulos obtenidos mediante la técnica de microaglutinación directa en placa fueron de 1/2560 para *C. kutscheri* y 1/5120 para *B. bronchiseptica*. Los antígenos y anticuerpos obtenidos demostraron ser eficientes para el desarrollo de la técnica de microaglutinación directa en placa..

PALABRAS CLAVE: animales de laboratorio; antígeno; anticuerpos; microaglutinación; *Corynebacterium kutscheri*; *Bordetella bronchiseptica*.

ANTIGENS AND ANTIBODIES PRODUCTION OF *Corynebacterium kutscheri* AND *Bordetella bronchiseptica* FOR DIAGNOSIS BY USING DIRECT MICROAGGLUTINATION TECHNIQUE IN LABORATORY ANIMALS

ABSTRACT: Microagglutination assay is one of the serological techniques used to detect bacterial infections in laboratory animal colonies. The objective of this research work is to produce antigens and antibodies for the diagnosis of *Corynebacterium kutscheri* and *Bordetella bronchiseptica*. These bacteria should be absent in rat and mice colonies. *Corynebacterium kutscheri* SL 5 and *Bordetella bronchiseptica* Japan NIH strain were cultured in specific bacteriological mediums. A dilution of $1,5 \times 10^9$ CFU/ml (tube n° 5 Mac Farland scale) for *C. kutscheri* and of $2,1 \times 10^9$ UFC/ml (tube n° 7) for *B. bronchiseptica* were obtained. The antigens produced from the bacteriological cultures were inoculated into rabbits following an immunization schedule in order to produce antisera. A title of 1/2560 for *C. kutscheri* and of 1/5120 for *B. bronchiseptica* were obtained by using the microagglutination test. Antigens and antibodies demonstrated to be efficient to perform the direct microagglutination test

KEY WORDS: laboratory animals; antigen; antibodies; microagglutination; *Corynebacterium kutscheri*; *Bordetella bronchiseptica*.

Fecha de recepción: 03/03/04

Fecha de aprobación: 04/06/04

Dirección para correspondencia: J. Laborde, Cátedra de Animales de Laboratorio. CC 296, (B1900AVW) La Plata, ARGENTINA.

E-mail: jmlabo@fvc.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

Los animales de laboratorio están expuestos a una diversidad de agentes patógenos que son ampliamente reconocidos como factores adversos en las investigaciones biomédicas. De acuerdo con las normativas internacionales estos microorganismos deben estar ausentes en las colonias de ratas y ratones de experimentación (1, 2, 3, 4). Mas allá de los efectos negativos sobre la salud de los animales estas infecciones pueden causar alteraciones en las funciones fisiológicas, provocando interferencias en los resultados de las investigaciones y ejerciendo una influencia negativa sobre el bienestar animal.

Corynebacterium kutscheri (Kutscher, 1894) y *Bordetella bronchiseptica* (Bordet, 1906) son agentes bacterianos patógenos secundarios, de distribución universal y de aparición frecuente en animales de experimentación (5, 6, 7). *C. kutscheri* se presenta habitualmente en forma latente en colonias de ratones convencionales produciendo manifestaciones clínicas cuando los animales se someten a procedimientos que causan inmunosupresión. La enfermedad se caracteriza por una septicemia masiva, aparición de embolia séptica en varios órganos, especialmente en hígado, riñón y menos frecuentemente en pulmón, piel y articulaciones. En las ratas predomina la enfermedad pulmonar. *B. bronchiseptica* es un microorganismo oportunista que infecta a colonias de ratas convencionales produciendo bronconeumonía aguda o subcrónica.

En las infecciones causadas por estas dos bacterias es difícil aislar estos microorganismos, en consecuencia, el uso de técnicas serológicas complementarias contribuye con el diagnóstico bacteriano (8, 9, 10).

La técnica de microaglutinación directa en placa se utiliza para el diagnóstico serológico de *C. kutscheri* y *B. Bronchiseptica*, debido a su alta especificidad, ya que es una prueba simple para detectar anticuerpos. En los países desarrollados estas pruebas están ya estandarizadas. En el caso de Argentina los controles microbiológicos, entre los que se incluye esta técnica, se establecieron a partir del año 1998 únicamente en la Cátedra de Animales de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata en respuesta a la creciente demanda de los investigadores usuarios debido a los requerimientos

en las publicaciones científicas concernientes a la calidad sanitaria de los animales de laboratorio que se utilizan en las investigaciones.

El factor de mayor importancia para realizar esta técnica radica en la obtención de la cepa bacteriana, a través de su aislamiento en animales infectados, o adquisición de la cepa patrón.

El objetivo de este trabajo fue producir antígenos y anticuerpos para la realización de la técnica de microaglutinación en placa para el diagnóstico serológico de *C. kutscheri* y *B. bronchiseptica*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del antígeno

Se procedió a cultivar la cepa virulenta de *C. kutscheri* SL5 (NIH, Japón) y cepa virulenta de *B. bronchiseptica* (NIH, Japón) en medio base agar sangre (Merck) adicionando 5 % de sangre equina y posterior incubación a 37°C en estufa de cultivo, en ambiente aerobio durante 24 h. Luego se realizaron las pruebas bioquímicas correspondientes con el objeto de confirmar la identidad y pureza del cultivo. Posteriormente para producir el antígeno, el cultivo obtenido se suspendió en una solución salina tamponada (PBS pH 7,2-0,01M) y se inactivó con 0,25 % (v/v) de formaldehído durante 72 horas. Luego se realizó el control de inactivación del antígeno mediante cultivo en caldo cerebro-corazón (Merck) durante 24 h e incubándolo a 37 °C en atmósfera aerobia y posterior siembra (100 µl) en medio base agar sangre (Merck) con 5 % de sangre equina, incubándolo a 37 °C en atmósfera aerobia durante 24 h. Verificada la inactivación de las suspensiones de los antígenos se lavó y centrifugó tres veces con PBS a 3000 rpm. Durante 20 min. El sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspendió en solución PBS-Tween-Azida sódica (1 %) y se almacenó a 4 °C. Para realizar la técnica de microaglutinación directa, el antígeno se diluyó en PBS estéril a fin de obtener una dilución de $1,5 \times 10^9$ UFC/ml (tubo número 5 de la escala de Mac Farland) para *C. kutscheri* (4, 11) y una dilución $2,1 \times 10^9$ U.F.C./ml (tubo número 7) para *B. bronchiseptica* según concentración estándar (3)

Programa de inmunización

Antes de comenzar el programa de inmunización los antígenos se controlaron con un suero control positivo anti-*C. kutscheri* y anti-

B. bronchiseptica (NHI, Japón) respectivamente. Se utilizaron como animales de experimentación, dos conejos (cepa Californiana) convencionales controlados microbiológicamente y libres de *C. kutscheri* y *B. bronchiseptica* de 2 kg de peso. Los animales se mantuvieron durante toda la experiencia de acuerdo con las recomendaciones de NIH (National Institute of Health, Japón) para el cuidado y uso de animales de experimentación.

Para realizar el control serológico se extrajo una muestra de sangre (4 ml) por punción de la vena marginal de la oreja de ambos animales las que se dejaron durante 24 h a 4 °C. Se centrifugó a 3000 rpm para obtener suero, el que se inactivó a 56 °C durante 30 minutos.

En las inoculaciones por vía subcutánea se utilizó una solución del antígeno obtenido y Adyuvante Completo de Freund (Freund Adjuvant, Complete F5881. SIGMA) en proporción 1/1 (v/v).

Para inocular los antígenos en los animales se siguió un programa según Tabla 1.

A los 25 días de la finalización del programa de inmunización se controló el título de anticuerpos de los animales. Para ello se extrajo una muestra de sangre (4 ml) de cada animal por punción en la vena marginal de la oreja. Luego las muestras se dejaron a 4 °C durante 24 h y se centrifugaron a 3000 rpm para obtener el suero que se inactivó a 56 °C durante 30 min. A los 27 días de la finalización del programa de inmunización y posterior al control y obtención del título de anticuerpos necesario para la técnica de microaglutinación directa en placa (3, 4, 11) los conejos se anestesiaron con Diazepan (2 mg/kg i/m) dejando actuar la anestesia durante 15 min y por punción cardíaca se

realizó el sangrado a blanco para procesar la sangre y obtener el suero patrón.

Los antígenos producidos fueron controlados con los antisueros obtenidos en el desarrollo del trabajo mediante la prueba de microaglutinación directa en placa.

La reacción de microaglutinación en placa consiste en la unión de un antígeno soluble a un anticuerpo específico.

Para realizar la técnica de microaglutinación en placa se siguió la siguiente metodología:

-El suero problema se inactivó a 56 °C durante 30 minutos y se diluyó 1:5 con PBS (pH 7,2 - 0,01M).

-En una placa para microaglutinación se colocaron 100 µl de suero, en el primer pocillo de la hilera y en los restantes 50 µl de PBS.

-Del primer pocillo se tomaron 50 µl de suero y se realizaron diluciones 1:2, en forma seriada hasta completar la hilera (1/5; 1/10; 1/20 y 1/40).

-Luego se colocaron 50 µl de antígeno en todos los pocillos.

-La placa se incubó a temperatura ambiente en cámara húmeda durante 18 horas.

-Se realizó la lectura evaluando la presencia o ausencia de aglutinación formado por somas bacterianos microaglutinados.

Siempre se deben incluir controles de suero positivos y negativos para evaluar los resultados de la técnica.

RESULTADOS

El antígeno que se obtuvo fue de una dilución de $1,5 \times 10^9$ UFC/ml (tubo número 5 de la escala de Mac Farland) para *C. kutscheri* y una dilución $2,1 \times 10^9$ UFC/ml (tubo número 7) para

Tabla 1. Programa de Inmunización.
Table 1. Immunization program.

Día	Vía de inoculación	Concentración (mg/ml)	Volumen (ml)
1	SC	1	1
3	IV	0,613	0,5
5	IV	1,25	0,5
7	IV	2,5	0,5
9	IV	5,0	0,5
11	IV	10,0	0,5

SC=Subcutánea (se utilizó Adyuvante Completo de Freund (V/V) en la inoculación)
IV=Intravenosa (vena marginal de la oreja)

B. bronchiseptica (3, 4, 11).

Se realizó un control del antígeno con sueros de conejo, rata y ratón no inmunizados, libres de *C. kutscheri* y *B. bronchiseptica* arrojando resultados negativos en la técnica de microaglutinación directa en placa.

El título del suero inmune controlado mediante la misma técnica fue de 1/2560 para *C. kutscheri* y 1/5120 para *B. bronchiseptica*.

La confirmación de la prueba de microaglutinación directa en placa utilizando los antígenos y sueros positivos obtenidos durante la experiencia demostraron ser eficientes para el diagnóstico serológico de *C. kutscheri* y *B. bronchiseptica*.

DISCUSIÓN

Las exigencias internacionales referidas a la estandarización y definición microbiológica de los animales de laboratorio son cada vez más estrictas. La Cátedra de Animales de Laboratorio de la Facultad de Cs. Veterinarias está trabajando para implementar técnicas para el diagnóstico microbiológico de ratas y ratones de laboratorio que permitan ofrecer a los investigadores un servicio, hasta ahora inexistente en Argentina. La pureza de los antígenos producidos, la titulación de anticuerpos en los sueros que se obtuvieron para *C. kutscheri* y *B. bronchiseptica* y la puesta en marcha de la técnica de microaglutinación directa en placa para el diagnóstico serológico de estos patógenos contribuirán a complementar el diagnóstico microbiológico en los programas de control sanitario en colonias de animales de laboratorio y a estudiar la prevalencia de estas infecciones en los Bioterios de nuestro país.

BIBLIOGRAFÍA

1. Detmer A. Zoonoses. In: Svendsen, P., Hau, J. (eds). Handbook of Laboratory Animal Science. New York: CRC Press, Inc. 1994; p. 71-78.
2. Kazuaki M. Definition of Microbiological Status of Rats and Mice. Microbial and Phenotypic Definition of Rats and Mice. National Research Council. 1998; p. 24-25.
3. Ohder H, Wullenweber M. *Bordetella bronchiseptica* in Diagnostic Microbiology for Laboratory Animal. Kunstyr, I. Ed. Gustav Fischer, New York. 1972; p. 57.
4. Gilioli R. Avaliação do perfil sanitário de colônias de camundongos e de ratos em biotérios brasileiros: ocorrência de bactérias, parasitas e vírus murinos. Campinas, Instituto de Biologia. UNICAMP 2003; Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular, Área de Concentração: Microbiologia). p. 150.
5. Amao H, Komuui Y, Sugiyama M, Takahashi KW, Sawada T, Saito M. Natural habitats of *Corynebacterium kutscheri* in subclinically infected ICGN and DBA/2 strains of mice. Lab Anim Sci. 1995; 45(1): 11-14.
6. Amao H, Komuui Y, Sugiyama M, Takahashi KW, Sawada T, Saito M. Natural and subclinical *Corynebacterium kutscheri* infection in rats. Lab Anim Sci. 1995; 45(1): 11-14.
7. Barthold SW, Brownstein DG. The effect of selected viruses on *Corynebacterium kutscheri*. Lab Anim Sci. 1998; 30: 50-55.
8. Barthold SW, Brownstein DG, Adams RL, Terwilliger GA, Aftomis F. Experimental *Corynebacterium kutscheri* infection in rats: bacteriology and serology. Lab Anim Sci. 1985; 35(2): 135-138.
9. Fujiwara K, Tanishima Y, Shumita S. Seromonitoring of laboratory mouse and rat colonies for common murine pathogens. Exp Anim. 1979; 28: 297-306.
10. Fox JG, Niemi SM, Ackerman J, Murphy JC. Comparison of methods to diagnose an epizootic of *Corynebacterium kutscheri pneumoniae* in rats. Lab Anim Sci. 1987; 37(1): 72-75.
11. Suzuki E, Mochida K, Takayama S. Serological survey of *Corynebacterium kutscheri* infection in mice and rats. Exp Animal. 1986; 35: 485-489.