



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS**  
**ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**



**“ESTABLECIMIENTO DE UNA FASE SÓLIDA CON UN ANTÍGENO LPS-R DE  
*BRUCELLA ABORTUS* CEPA RB51, PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS  
CONTRA LPS-R DE *BRUCELLA OVIS*”**

**CAROLINA MARAMBIO REINOSO**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Medicina  
Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: PEDRO ÁBALOS PINEDA

SANTIAGO, CHILE

2007

## RESUMEN

La brucelosis ovina causada por *Brucella ovis* es una enfermedad infectocontagiosa que afecta a los ovinos, principalmente a los machos, que cursa con alteraciones reproductivas que merman los indicadores productivos de los rebaños. En hembras la susceptibilidad a la infección es menor y puede causar abortos. Existen pocos estudios sobre la prevalencia en Chile. Sólo hay estudios parciales que muestran que la seroprevalencia en algunos predios es de 52% (Arévalo, 2004).

Este trabajo tuvo por objetivo desarrollar un ELISA-I utilizando un antígeno soluble de la cepa rugosa *B. abortus* RB51, extraído mediante el método de Galanos *et al* (1969), para la detección de anticuerpos contra *B. ovis* en sueros de carneros previamente estudiados en los Laboratorios de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Chile. Las alternativas evaluadas fueron placas Nunc 69620 y Maxisorp con 2 temperaturas de sensibilización (4°C y ambiente) y “buffers” carbonato/bicarbonato pH 9,6 y PBS pH 7,2. Se utilizaron 6 diluciones de antígeno (1/10, 1/100, 1/1000, 1/2000, 1/5000 y 1/10000) y 4 de conjugado (1/4000, 1/6000, 1/8000 y 1/10000). Se estudiaron dos grupos de animales: los inoculados experimentalmente con 2 cepas de *B. ovis* (una de laboratorio y otra de campo) y los de animales sospechosos de campo. La infección estaba comprobada por el diagnóstico previo mediante las pruebas de inmunodifusión en gel de agar (AGID) y contraelectroforesis, en los sueros recibidos en el laboratorio, clasificándolos en positivos y negativos. En los animales cuya infección fue experimental, se extrajo una muestra antes de la inoculación (sueros considerados negativos) y 35 días posteriores a una segunda inoculación (sueros considerados positivos).

Los sueros de los animales infectados de campo arrojaron resultados de densidad óptica (DO) más altos que los de inoculados experimentalmente, incluso en algunos casos los valores fueron casi el doble. También se observó un efecto similar en los valores de DO de animales negativos, donde los valores DO de los sueros negativos de campo eran muy similares a los de positivos inoculados. Estos bajos valores de DO de los sueros positivos inoculados, podría ser explicado por la patogenicidad atenuada de la cepa de laboratorio o que las dosis inoculadas fueron insuficientes para provocar una seroconversión de magnitud similar a la presentada por los animales expuestos naturalmente a la infección.

Para calcular la Razón de Absorción (RA) con el fin de reconocer las mejores alternativas de fase sólida, se utilizaron los valores de DO de los sueros de animales negativos previa inoculación y los valores de DO de los animales de campo positivos.

Los mejores resultados de RA (5,72 en la placa sensibilizada a 4°C y 5,29 a temperatura ambiente) fueron obtenidos en las placas Nunc 69620, con “buffer” carbonato/bicarbonato, dilución de 1/10 y 1/6000 de antígeno y conjugado, respectivamente. Estos resultados son concordantes con los trabajos realizados anteriormente por varios autores.

Estos resultados demuestran que existió adhesión de LPS-R de *B. abortus* RB51 a la placa de poliestireno y reconocimiento de los anticuerpos del suero de los animales positivos contra *B. ovis* con el LPS-R adherido. Por lo tanto, se podría desarrollar un ELISA-I utilizando como antígeno soluble el LPS-R de *B. abortus* cepa RB51, con un estudio que abarque mayor número de muestras.

**Palabras claves:** *Brucella ovis*, *Brucella abortus* RB51, LPS-R, ELISA.

## SUMMARY

The ovine brucellosis caused by *Brucella ovis* is mainly an illness that causes in rams reproductive alterations that affects the productive levels of the flocks. In ewes the susceptibility to the infection is lower and it can cause abortions. Few studies exist in Chile and show a prevalence in some properties around a 52% (Arévalo, 2004).

This work had for objective to develop an ELISA test using a R-LPS soluble antigen, obtained by the Galanos method, from the rough strain *B. abortus* RB51, to detect antibodies against *B. ovis* in ovine sera previously studied in the Laboratory of Microbiology of the Faculty of Veterinary and Husbandry Sciences of University of Chile. Several alternatives to plate sensitization were evaluated: Nunc 69620 and Maxisorp microplates, two temperatures for sensitization (4°C and 18°C) and two sensitization buffers. pH 9.6 and pH 7,2 (carbonate/bicarbonate and PBS respectively). Six antigen dilutions (1/10, 1/100, 1/1000, 1/2000, 1/5000 and 1/10000) and four conjugated dilutions (1/4000, 1/6000, 1/8000 and 1/10000) were used. Two groups of animal sera were studied: those experimentally inoculated with 2 strains of *B. ovis* (one of laboratory and another of field) and others field samples previously tested in the laboratory using agar gel immunodifusion (AGID) and counterimmunoelectrophoresis. Sera from experimentally infected animals were obtained previously to the infection (sera considered as negative) and 35 days after their second inoculation of *B. ovis* (sera considered as positive).

Sera from field infected animals showed higher optical density (OD) values that those showed by animals inoculated experimentally, even in some cases the values were almost twice. A similar effect was also seen in the OD values negative sera, where the field negatives were very similar to the inoculated positives. The reduced OD values of the sera from inoculated animals could be

explained by an attenuated pathogenicity of a laboratory strain or that the inoculated doses were insufficient to produce an adequate seroconversion of similar magnitude to that showed for the field sera.

To calculate the Binding Ratio (BR), to detect the better solid phase alternatives, the OD from previous inoculated animals (negative sera) and field infected animals (positive sera) were used.

The best BR results (BR=5.72 in the plates sensitized at 4°C and BR=5.29 plates sensitized room temperature) they were obtained in the plates Nunc 69620, using carbonate/bicarbonate buffer with a 1/10 antigen dilution and a 1/6000 of conjugate dilution. These results are similar with works carried out previously by several authors.

This work achieved with the adhesion of LPS-R of *B. abortus* RB51 to the poliestirene plates and detected antibodies against *B. ovis* in the sera of field and experimentally infected animals. Following steps would be to develop a standardized ELISA to improve the tools for ovine brucellosis diagnosis caused by *Brucella ovis*.

**Key words:** *Brucella ovis*, *Brucella abortus* RB51, R-LPS, ELISA.

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	.....	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	.....	3
HIPÓTESIS	.....	19
OBJETIVOS	.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS	.....	20
RESULTADOS	.....	27
DISCUSIÓN	.....	29
CONCLUSIONES	.....	32
BIBLIOGRAFÍA	.....	33

## INTRODUCCIÓN

El sector ovino es uno de los sectores productivos más tradicionales y con una presencia muy antigua en el país; sin embargo, es uno de los menos desarrollados en términos productivos y comerciales.

El Censo Nacional Agropecuario aplicado en el año 1997, determinó que la masa ovina del país era de 3.695.062 cabezas, lo cual representó el 34,3% de la masa ganadera total. Estas cifras indican la importante participación de esta especie en la economía pecuaria nacional. La distribución de la masa ganadera ovina a lo largo del país es heterogénea, concentrándose mayoritariamente en la XII Región con el 52% del total nacional.

Instituciones como el Fondo de Innovación Agraria (FIA) y el Instituto de Investigación Agropecuaria (INIA), han desarrollado una serie de iniciativas enfocadas a la diversificación del producto cárnico, mediante la introducción de genética especializada, destinada a la obtención de un producto acorde a los requerimientos de mercado.

Dentro de las limitaciones a la productividad del sector, representan un factor importante las enfermedades infecciosas ovinas presentes en el país. Entre estas, la epididimitis del carnero, enfermedad bacteriana crónica producida por *Brucella ovvis* que afecta exclusivamente a los ovinos y sobre todo a los machos, produce alteraciones reproductivas que inciden en la eficiencia de la explotación.

El efecto de esta enfermedad en las explotaciones ovinas se manifiesta en una baja de los índices reproductivos, un alto número de carneros descartados anualmente, acortamiento de la vida reproductiva de los machos, abortos esporádicos, mortalidad perinatal y la consecuente disminución de los rendimientos de carne y lana por hectárea.

Esta enfermedad ha sido reportada por la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) en los principales países productores de ovinos del mundo y en América del Sur esta patología es de importancia en Argentina, Uruguay, Chile, Perú y sur de Brasil. No existen estudios de prevalencia a nivel nacional y no hay información disponible respecto de las pérdidas económicas que esta enfermedad ocasiona.

El control de la enfermedad se basa en el diagnóstico y eliminación de los machos afectados. Sin embargo debido a deficiencias de las pruebas de diagnóstico y el costo que implica la erradicación, la enfermedad es difícil de eliminar de los rebaños. Permanentemente se están buscando alternativas de diagnóstico que permitan detectar y controlar eficientemente la enfermedad, donde la prueba ELISA presenta ventajas por poder realizarse sobre un gran número de muestras simultáneamente y es fácil de estandarizar. Este trabajo intenta desarrollar una fase sólida para una prueba ELISA que detecte anticuerpos ovinos contra *Brucella ovis*, utilizando como antígeno LPS-R de *Brucella abortus* RB51.



## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1.-ETIOLOGÍA

La epididimitis del carnero es una enfermedad infectocontagiosa crónica producida por *Brucella ovis*, bacteria aislada por primera vez en Nueva Zelanda por McFarlane *et al.* en el año 1952 y simultáneamente en Australia por Simmons y Hall (1953). Inicialmente fue considerada como una mutación estable de *Brucella melitensis* y luego, Buddle y Boyes propusieron denominarla *Brucella ovis* llamando a la enfermedad “epididimitis contagiosa del carnero” (Buddle y Boyes, 1953).

#### 1.1.- Características y estructura bacteriana

*Brucella ovis* es una bacteria Gram negativa, acapsulada, no esporulada, bacilar o cocobacilar, que carece de pili o flagelo y es susceptible de ser teñida por el método Stamp o de Macchiavello. *B. ovis* crece en medios como tripticasa soya, agar sangre o agar Columbia, enriquecidos con suero normal equino, bovino u ovino en una concentración final del 5 al 10% y en una atmósfera con 5-10 % de CO<sub>2</sub> (Alton *et al.*, 1988), aunque se han aislado cepas CO<sub>2</sub> independientes (Blasco, 1990). Las colonias son generalmente visibles después de 3 a 5 días de incubación a 37°C, aunque también pueden crecer a 27°C, apareciendo éstas entre los días 6 a 10 de incubación (Blasco, 1990). Para un primer aislamiento desde semen, muestras de necropsia o mucus cervical es necesario utilizar como medios sólidos de cultivo agar Thayer Martin modificado o agar Skirrow, ya que éstos permiten el crecimiento exclusivo de *Brucella ovis*, inhibiendo la flora normal bacteriana de vagina o prepucio (Paolicchi *et al.*, 1991).

Observaciones de microscopía electrónica muestran que las especies del género *Brucella* presentan una envoltura celular trilaminar constituida por una membrana interna o citoplasmática, separada de la membrana externa (ME) por un espacio

periplásmico rico en proteínas solubles y peptidoglicano (PG) (Dubray y Plommet, 1976).

En la ME se encuentran dos grupos de antígenos mayores: el lipopolisacárido rugoso (LPS-R) y las proteínas de membrana externa (PME). Ambos se encuentran expuestos en la superficie de la ME presentando epitopos accesibles a los anticuerpos, ya que carecen del impedimento de la cadena O del lipopolisacárido presente en las cepas lisas de *Brucella* (Estein, 1999). El LPS-R es una molécula compleja y de bajo peso molecular compuesto por el lípido A y un núcleo o "core" constituido por oligosacáridos de glucosa, manosa y el ácido 3-desoxi-D-mano-2-octulosónico (KDO). Este último se encuentra en mayor proporción en *B. ovis* con respecto del resto de las especies de *Brucella* (Moreno *et al.*, 1984). La membrana externa de *B. ovis* contiene dos grupos de PME que se clasifican en mayores y menores de acuerdo a su abundancia relativa, las cuales se hallan estrechamente unidas al LPS-R (Estein, 1999). Existen epitopos en el LPS-R compartidos con otras cepas rugosas de *Brucella*, pero también los hay específicos para *B. ovis* (Moreno *et al.*, 1984).

Los genes que codifican para las PME mayores se encuentran conservados en las distintas especies de *Brucella*. Esto explicaría la reacción cruzada entre brucelas de las diferentes especies (Blasco, 1990).

## **2.- EPIDEMIOLOGÍA**

Esta enfermedad está distribuida en todos los países productores de ovinos. En aquéllos con programas avanzados de control la incidencia es baja, pero la erradicación completa es extremadamente difícil de lograr por razones económicas y de manejo (OIE, 2000).

La especie ovina es la única naturalmente infectada. Se han realizado experiencias de infección experimental en caprinos adultos y jóvenes pero se observó que son menos sensibles que los carneros y si cursa con la infección es leve y de corta duración (García Carrillo *et al.*, 1974).

En estudios serológicos en el hombre, se han hallado reacciones positivas, pero no existen casos reportados de enfermedad, ya que no es de carácter zoonótica (Meyer, 1982, citado por Estein, 1999).

Existen variadas causas de alteraciones reproductivas en los machos de un rebaño, que genéricamente son conocidas como “epididimitis”, como aquella que afecta a animales jóvenes y sin experiencia sexual, causada por *Histophilus ovis*, *Haemophilus somnus* y *Actinobacillus spp*, los cuales son parte de la flora bacteriana normal de las mucosas del tracto reproductivo de los corderos y son patógenos oportunistas. Causan infecciones ascendentes al epidídimo y ocasionalmente al testículo y órganos sexuales accesorios. Sin embargo los factores específicos que predisponen a estos órganos no están claramente definidos. Estos microorganismos también están involucrados en cuadros de artritis, laminitis, septicemia y meningitis. Otros microorganismos como *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Bacteriodes spp.*, *Escherichia coli*, *Pasteurella spp.*, *Streptococcus spp.* y *Staphylococcus spp.* pueden ser aislados del epidídimo e inducir lesiones en éste y en el testículo (Bulgin *et al.*, 1990).

La iniciación de la actividad sexual de los carneros los hace más susceptibles a la infección y esto ocurre a partir de los 4 meses de edad. Se asocia una mayor susceptibilidad de infección a las razas británicas debido a su precocidad. La raza Merino sería genéticamente más resistente a la infección bajo las mismas condiciones que las anteriormente nombradas (Mercy *et al.*, 1985).

Las hembras, en cambio, tienen una relativa resistencia. Luego de ser infectadas en la cruce, sólo algunas de ellas desarrollan una infección activa. La bacteria es excretada en descargas vaginales y en la leche, por lo tanto, también puede infectar al macho y a sus corderos (Blasco, 1990).

Existen variadas causas bacteriológicas de placentitis en ovejas (*B. melitensis*, *Coxiella burnetti* y *Chlamydia psittacci*), por lo tanto es necesario realizar un diagnóstico diferencial para definir el verdadero agente etiológico de la infección (Blasco, 1990).

### **3.- PATOLOGÍA**

*B.ovis*, al igual que las otras brucelas, ingresa al organismo a través de las membranas mucosas (nasal, oral, conjuntival, vaginal o rectal), o vía percutánea (heridas y escoriaciones). En machos, la principal ruta de transmisión es la venérea pasiva, la que suele ocurrir por contacto directo con semen infectado al interior de la vagina o por conductas sodomíticas. Esto ocurre cuando carneros infectados montan a los de menor rango, siendo ésto agravado cuando en un acto de sumisión el carnero sodomizado lame el prepucio del macho dominante (Blasco, 1990; OIE, 2000). En carneros vírgenes el contagio se produce por vía oral o conjuntival, debido al contacto con orina de animales infectados durante estabulación prolongada (Bulgin, 1990).

Luego de la entrada de la bacteria al organismo, ésta se disemina a través del torrente sanguíneo y se ubica en los linfonódulos cercanos al sitio de entrada donde tiene un período de latencia relativamente largo. Posteriormente, luego de una bacteremia de 2 a 3 semanas se produce una localización inicial en el epidídimo, que es acompañada por edema perivascular, infiltración de linfocitos, monocitos y neutrófilos en el tejido peritubular del mismo. Existe destrucción

del epitelio germinativo por la bacteria o por la reacción inflamatoria y extravasación de espermatozoides, lo cual puede causar un granuloma espermático que lleva a una degeneración testicular y fibrosis. Generalmente la epididimitis es unilateral, ubicándose preferentemente en la cola del epidídimo (Blasco, 1990).

En infecciones experimentales en carneros, la bacteria ha sido aislada de hígado, riñón, bazo, testículos, epidídimos, glándulas vesicales, glándulas bulbouretrales y ampolla del conducto deferente; linfonódulos ilíaco, preescapular, precrural, submaxilar, parotídeo y retrofaríngeo. Los órganos blanco de la bacteria son epidídimo y glándulas sexuales accesorias, por lo tanto, la excreción de ella a través del semen es muy probable, aunque también se han reportado animales seropositivos con cultivo de semen negativo (Blasco, 1990).

Macroscópicamente, el epidídimo afectado se palpa indurado debido a la proliferación de tejido conectivo. Pueden encontrarse uno o más abscesos. Algunas veces los espermatoceles se rompen y provocan hemorragia e inflamación exudativa en la túnica vaginal. Al organizarse el tejido conectivo producto de la inflamación, se produce adhesión de las ambas capas de la túnica vaginal (Blasco, 1990).

Microscópicamente, el epidídimo afectado sufre edema interticial, fibrosis e infiltración perivascular de linfocitos y células plasmáticas. El ducto epididimal muestra hiperplasia epitelial con quistes intraepiteliales. Es frecuente encontrar granulomas con extravasación de esperma con linfocitos, células epiteliales y células gigantes (Blasco, 1990).

En las vesículas seminales existe infiltración de células plasmáticas y linfocitos, fibrosis y una extendida hiperplasia con quistes intraepiteliales.

En la ampolla del conducto deferente, se desarrolla una inflamación con áreas focales de hiperplasia con quistes intraepiteliales y acumulación de neutrófilos en el lumen. En la próstata y glándulas bulbouretrales se observa infiltración de células inflamatorias e hipertrofia glandular focalizada. Se encuentran formaciones papilares y concreciones en ambas glándulas accesorias (Blasco, 1990).

El volumen de semen eyaculado no sufre modificaciones, pero la concentración espermática sufre una notoria merma, especialmente entre los días 60 y 105 post infección. Algunas características de calificación del semen se ven afectadas, tales como movimiento progresivo y presencia de anomalías en espermios, especialmente cabezas desprendidas y acrosomas rugosos y con puntos de condensación (Orellana, 1982). Cameron y Lauerman (1976), observaron en su estudio que la cola del espermio sufre un enroscamiento alrededor de la cabeza y que mientras mayores sean las lesiones epididimales, mayores son las alteraciones de cabeza de los espermios. En fases crónicas de la enfermedad existe una atrofia testicular y aumento del tamaño en la cola del epidídimo (Blasco, 1990).

Las lesiones palpables aparecen alrededor de las 2 semanas posinfección (Bulgin, 1990). Otros signos clínicos tempranos de la infección son inflamación de los testículos, dolor local y acumulación de líquido dentro de la bolsa escrotal (Simmons y Hall, 1953).

La exposición experimental de hembras a *B. ovis*, ya sea antes de la cruce o en la gestación tardía, no provoca aborto. En hembras no preñadas que desarrollan una infección, causa vaginocervicitis y endometritis que provoca una infertilidad temporal, sin embargo, estas lesiones no son patognomónicas de la infección (Homse *et al.*, 1995) En ovejas expuestas experimentalmente durante la gestación inicial o media, si desarrollan la infección, genera una placentitis. El resultado de esta placentitis es el nacimiento de crías débiles con el consiguiente

aumento de la mortalidad perinatal del rebaño. Los corderos pueden infectarse en el período de lactancia, ya que se produce una descarga bacteriana en la leche (Blasco, 1990).

## **4.- DIAGNÓSTICO**

### **4.1.- Diagnóstico clínico**

En las explotaciones ganaderas, aproximadamente 60 días antes del inicio de la temporada de encaste, se realiza un examen reproductivo con el fin de detectar con suficiente tiempo afecciones recuperables, poder descartar a todos los carneros que presentan problemas irreversibles y preveer, si fuera necesario, la compra de reproductores con certificado libre de *B. ovis*. Se realiza una observación y evaluación de los carneros separados por edad. En este momento, además de evaluar caracteres productivos de valor económico, se observará presencia de lana en la cara, arrugas en el cuerpo, tamaño de los testículos, tamaño y estado corporal, aparato locomotor, aplomos y cualquier anomalía apreciable a distancia (Manazza, 2004).

La existencia de lesiones testiculares concordantes con epididimitis pueden ser un indicador de la infección de *B. ovis*, sin embargo existen otras bacterias aisladas comúnmente en carneros con epididimitis como: *Actinobacillus seminis*, *Actinobacillus actinomycetes-concomitans*, *Histophilus ovis*, *Haemophilus spp.*, *Corynebacterium pseudotuberculosis (ovis)* y otras. Incluso animales infectados que muestran lesiones a la palpación, a las pocas semanas pueden volver a la normalidad, aunque en cortes histológicos presenten lesiones en epidídimo o glándulas accesorias (Bulgin y Anderson, 1983). Sólo el 50% de los animales infectados con *B. ovis* desarrollan alteraciones testiculares detectables a la

palpación (Blasco, 1990) por lo tanto el examen clínico tiene muchas deficiencias para un buen control.

#### **4.2.- Diagnóstico bacteriológico**

El diagnóstico bacteriológico se realiza mediante el aislamiento del agente a partir de semen, testículo afectado, glándulas anexas y placentas infectadas (Webb *et al.*, 1980).

Las muestras de semen son obtenidas mediante el electroeyaculador. Esta muestra es fijada en un portaobjeto y teñida por método Stamp o Gram, luego se estudia la morfología de la bacteria. Ante la presencia de microorganismos sospechosos, se siembra una muestra en medio de cultivo Thayer-Martin en incubación al 10% de CO<sub>2</sub>, se esperan 10 días antes de examinar la placa y darla por negativa (Blasco, 1990).

La inmunofluorescencia (directa e indirecta), ha sido exitosamente utilizada para la identificación específica de *B. ovis* desde las muestras de semen (Ajai *et al.*, 1980).

Se han desarrollado técnicas de reacción en cadena de polimerasa (PCR), con el propósito de detectar el ácido nucleico del agente. Manterola *et al.* (2003), describieron una prueba PCR que arrojó como resultado una sensibilidad similar al cultivo desde semen. La escasa cantidad de *B. ovis* en las muestras de semen de carneros infectados en fase crónica de la infección, justifica el uso de esta técnica para el diagnóstico directo.

Debido a que el animal infectado elimina intermitentemente la bacteria en sus secreciones, el diagnóstico bacteriológico no es confiable.



### 4.3.- Diagnóstico serológico

Diversos métodos serológicos han sido desarrollados a lo largo del tiempo para detectar anticuerpos contra *B. ovis*. Las pruebas de aglutinación no son adecuadas para el diagnóstico de esta especie, debido a la naturaleza autoaglutinante de las células en suspensión (Estein, 1999).

Las pruebas utilizadas para la detección de anticuerpos contra *B. ovis* son la inmunodifusión en gel de agar (IDGA), la prueba de fijación del complemento (FC) y diversos enzimoimmunoensayos (ELISA), que utilizan antígenos solubles obtenidos de la superficie de *B. ovis*. Algunos ELISA, en ensayos de campo, han usado proteínas recombinantes y anticuerpos monoclonales. La sensibilidad de IDGA y ELISA son similares y muchas veces ELISA demuestra una sensibilidad mayor que FC. Hasta ahora la IDGA debido a su simplicidad y costo ha sido la más utilizada. Sin embargo, FC sigue siendo aquella prescrita para el comercio internacional (OIE, 2000).

La prueba ELISA supera la sensibilidad y especificidad de todas las otras pruebas nombradas anteriormente y permite el procesamiento simultáneo de gran número de muestras, además la hemólisis o anticomplementariedad del suero no afecta la reacción (Estein, 1999).

El método ELISA indirecto (ELISA-I) ha sido utilizado por varios autores, siendo el tipo de sustrato y antígeno seleccionado las diferencias entre ellos. La sensibilidad y especificidad de esta prueba depende mayormente de la calidad del anticuerpo, conjugado y del antígeno utilizado (Blasco, 1990).

López *et al.* (2005) desarrollaron un ELISA-I usando un antígeno de la cepa (M-) de *B. canis* y lo compararon con un antígeno de *B. ovis*. Se obtuvo similar especificidad y sensibilidad en ambos ELISA-I. La ventaja del uso de este

antígeno, proveniente de *B. canis*, radica en sus características de cultivo, ya que no necesita medio enriquecido, ni CO<sub>2</sub> como *B. ovis*.

Posteriormente los mismos autores desarrollaron un ELISA-I para la detección de anticuerpos contra *B. ovis* en la leche de ovejas en lactancia. Utilizaron dos antígenos distintos, uno derivado de *B. canis* y otro de *B. ovis*. Sus resultados fueron buenos, pero para validar estas técnicas diagnósticas se necesitan nuevos estudios que abarquen una mayor población de animales. Si se aplica este método, disminuirían los costos de diagnóstico, ya que para la obtención de la muestra no se incurriría en gastos mayores, además es mucho más simple, ya que no es invasivo (López *et al.*, 2006).

La prueba ELISA tiene varias ventajas comparativas frente a otras pruebas diagnósticas, por ejemplo, la posibilidad de analizar varias muestras a la vez, lo automatizado del proceso, la estabilidad de los reactivos, etc. Las desventajas de esta prueba radican más bien en los costos de implementación de la misma, precios de los equipos computacionales, procesadores de datos, precios de los reactivos, etc. (Nielsen *et al.*, 1996).

#### **4.4.- Diagnóstico por hipersensibilidad tardía**

El diagnóstico sobre la base de la respuesta de hipersensibilidad tardía estimulada por *B. ovis*, se realiza mediante una prueba cutánea, utilizando como alérgeno una brucelina. Los antígenos involucrados en la respuesta de hipersensibilidad son mayoritariamente proteínas solubles (Estein, 1999). La desventaja de este método es su falta de especificidad, pues existen reacciones cruzadas en animales infectados con *B. melitensis* o vacunados con la Cepa REV-1 (Blasco, 1990).

## **6.- CONTROL**

### **6.1.- Diagnóstico y sacrificio**

Las medidas de control tienden a la identificación y eliminación de los animales seropositivos y/o con epididimitis clínica, evitando además la introducción de animales infectados. Se recomienda la implementación del cultivo bacteriológico del semen como complemento al examen clínico, así como la realización de pruebas serológicas pre-encaste (Paolicchi *et al.*, 1992).

### **6.2.- Vacunación**

La vacunación es la única medida de control disponible en países con gran incidencia de infección por *B. ovis*, ya que en estas áreas la erradicación por medio de pruebas serológicas y eliminación de animales es económicamente impracticable (Blasco, 1990).

Se han utilizado mezclas de *B. ovis* y *B. abortus* cepa 19, como vacunas. Las desventajas de la cepa 19 radican en la posibilidad de colonizar los testículos y ser eliminada por el semen por largos periodos posvacunación, con el riesgo de causar epididimitis. También se han descrito casos de laminitis y epifisitis como reacción a la vacunación con esta cepa (Blasco, 1990).

También se estudió el uso de la cepa 42/50 de *B. abortus* con buenos resultados protectivos frente al desafío a la infección, pero no sería aplicable debido a la seroconversión detectable en pruebas serológicas que alterarían el diagnóstico (Pinochet *et al.*, 1987).

Bagues *et al.*, (1995), investigaron la posibilidad de que la vacuna *B. abortus* cepa RB51 protegiera a los carneros frente a la infección de *B. ovis*. El resultado de este estudio concluyó que RB51 no confiere inmunidad adecuada en ovejas frente al desafío de infección con *B. ovis*.

También se utiliza *B. melitensis* cepa REV-1 como cepa vacunal, inoculada vía subcutánea o conjuntival en dosis única en carneros de 3 a 5 meses de edad, confiere una adecuada inmunidad contra *B. ovis* y *B. melitensis*. En Chile no está autorizada esta vacuna, ya que *B. melitensis* no ha sido detectada como problema en caprinos (Núñez *et al.*, 1986).

Estudios con *B. melitensis* cepa REV-1, concluyeron que no es excretada en el semen de carneros vacunados, tampoco se pudo aislar de los órganos colonizados generalmente por la infección, por lo tanto, podría utilizarse en lugares donde la bacteria *B. melitensis* no esta presente (Blasco *et al.*, 1987).

Se están desarrollando nuevas vacunas basadas en el complejo de membrana externa de *B ovis* encapsulada en micropartículas de poly-e-caprolantona (PEC). Vacunaciones subcutáneas de antígeno de *B ovis* (extraído por el método salino-caliente) en micropartículas de PEC inducen una adecuada respuesta serológica y confiere similar protección que la inducida por *B. melitensis* REV-1. La ventaja sobre la vacunación con *B. melitensis* REV-1 radica en que animales vacunados con este antígeno encapsulado no dan seropositivos a las pruebas diagnósticas Rosa de Bengala y Fijación del complemento, por lo tanto se podría ocupar en una población sin miedo a que surjan falsos positivos (Muñoz *et al.*, 2006).

En bovinos, la prevención de la brucelosis producida por *B. abortus* se basa en la utilización de la vacuna *B. abortus* Cepa RB51. Esta cepa fue desarrollada en 1984 por el Dr. Gerhardt Schurig, quien a partir de la cepa virulenta 2308 de *B. abortus* lisa, seleccionó y clonó mediante sucesivos pasajes en medio de cultivo que contenía rifampicina, obteniendo una cepa rugosa. Este clon fue llamado *Brucella abortus* RB51 (Rough *Brucella* subculture 51) y se encontró que había perdido la habilidad de sintetizar la cadena "O" de la fracción polisacárida que normalmente está presente en la superficie de brucelas lisas y, además, es un antígeno muy inmunodominante, también se atenuó su virulencia (Lopetegui, 1997). La

importancia de la ausencia de este antígeno, radica en que las pruebas diagnósticas actualmente en uso para brucelosis bovina se basan en la detección de anticuerpos frente a epítopes de la cadena "O" de *B. abortus* y, por lo tanto, reaccionan cuando el animal está realmente infectado o cuando ha sido vacunado con *B. abortus* cepa 19 (Ábalos *et al.*, 1996), en cambio, animales vacunados con la cepa RB51 no reaccionan en estas pruebas.

### **6.3.- Prevención**

La prevención se basa en el manejo de los carneros en los predios y en la minuciosidad del examen reproductivo de los machos previo al encaste. Una vez examinados los carneros, frente a cualquier anormalidad testicular palpable, debe eliminarse al animal del predio. Una medida básica de manejo y fácil de aplicar es la separación en corrales aislados de los carnerillos de los carneros experimentados, para evitar contagios y diseminación de la bacteria en el rebaño. La incorporación de animales provenientes de predios libres certificados es una gran medida de protección frente al ingreso de esta bacteria al rebaño (Manazza, 2004).

## **7.- TRATAMIENTO**

Existen varios protocolos indicados para el tratamiento con antibióticos de carneros infectados, pero al ser *B. ovis* una bacteria intracelular facultativa los períodos de administración de éstos son muy largos y las dosis altas, por lo tanto, es económicamente inviable; además, los resultados son muy variables. Se recomienda tratar sólo a aquellos animales de alto valor genético y sin lesiones epididimarias irreversibles (Bulgin *et al.*, 1990).

Combinaciones de auromicina con estreptomycinina son capaces de eliminar la diseminación seminal y sanar la epididimitis. Estudios con carneros infectados experimentalmente y tratados con oxitetraciclina combinada con estreptomycinina,

dieron como resultado un 91,7% de éxito, mientras que los animales medicados sólo con oxitetraciclina presentaron un 33,3% de remisión de la infección (Marín *et al.*, 1989).

## **8.- SITUACIÓN NACIONAL**

La distribución de la masa ganadera ovina a lo largo del país es heterogénea, concentrándose mayormente entre la XI y XII regiones con el 63% del total nacional. En estas regiones, predomina ampliamente la raza Corriedale (Chile, INE, 1997).

Chile exporta 5500 toneladas de carne de cordero; 3700, se venden en países de la Unión Europea y 1800 en otros mercados como México y Estados Unidos (Chile, ODEPA, 2005). La XII Región de Magallanes concentra más del 50% de la masa ovina nacional (Chile, MINAGRI, 2006) y exporta a Europa el 97% de la producción nacional de cordero (Chile, INE, 1997). El país tiene posibilidades de vender 5400 toneladas de esta carne a la Unión Europea y cubrir la cuota otorgada a nuestro país.

Entre la IV y X región se ubica el resto de la masa ovina, constituida principalmente por rebaños pequeños a medianos y con razas como Merino Precoz Alemán, Suffolk Down, Hampshire Down y Romney Marsh. Estos rebaños están en manos de medianos y pequeños productores, presentando en su mayoría una baja viabilidad económica y están provocando una acelerada degradación del medio ambiente (Pérez, 2005).

Las explotaciones están enfocadas principalmente a la producción de carne, la que representa un consumo nacional, sin considerar la venta informal de carne ovina, de 0,3 a 0,5 Kg. por habitante al año.

El Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) publicó en Marzo del 2006 un estudio sobre el potencial ovino nacional, que señala que al implementar un

plan de crecimiento poblacional, Chile podría aumentar considerablemente la cantidad de carne ovina producida anualmente de las 10 mil toneladas actuales a 370 mil en un plazo de 30 años. En este último punto, la Fundación para la Innovación Agraria (FIA), junto con la Universidad Austral de Chile, apoyan este plan de crecimiento al fundar el primer centro de biotecnología reproductiva ovina de alta calidad. El principal objetivo de esta unidad es la obtención de material genético de distintas razas de interés productivo y de alto valor genético, con certificación de calidad y trazabilidad de origen (Chile, MINAGRI, 2006).

Este proyecto beneficiará, con la incorporación de genética de alta calidad a través de embriones, carneros y semen de alta calidad, a las regiones VII, X y XII. Se espera un aumento de los niveles productivos, mejor calidad del producto y menores gastos de producción.

Para que todo este esfuerzo en mejorar la cantidad y calidad de los productos derivados de la cría ovina tengan éxito, es necesario mejorar el estado sanitario de los rebaños mejorando los métodos diagnósticos de las enfermedades más comunes e influyentes en la reproducción de los ejemplares. Una de estas enfermedades reproductivas importantes es la epididimitis del carnero, producida por *Brucella ovis*. En el año 1965, la infección por la bacteria fue detectada por primera vez en sueros provenientes de la zona central del territorio nacional. La bacteria fue aislada por primera vez en 1968 en carneros de la zona central, posteriormente la enfermedad ha sido encontrada en varios lugares del país (Pinochet *et al.*, 1981).

Los Drs. Mackinnon y Díaz (1969), realizaron un estudio de las causas de eliminación de carneros Corriedale en la provincia de Magallanes y descubrieron que el 44, 91% de la causal de eliminación de los animales desechados cada temporada correspondía a epididimitis.

Estudios realizados en diversas áreas, a pesar de ser locales y parciales, muestran prevalencias de la infección de un 5 a un 17% (Pinochet *et al.*, 1981). Rojas *et al.* (1990), observaron una prevalencia de 2,8 a 8,3% en ovinos adultos de rebaños de pequeños productores de la X Región.

En la Región XI de nuestro país, un estudio que abarcó 25 predios, sometió a 876 carneros en edad reproductiva a la detección serológica mediante un ELISA Indirecto. Los resultados arrojaron que un 34% de las muestras de suero fueron positivas y se estimó una seroprevalencia predial de un 52% para *B. ovis* (Arévalo, 2004).

En el laboratorio de Microbiología Clínica de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, de un total de 2.212 muestras de sangre recibidas entre los años 1995 y 2005, 583 dieron positivas a *B. ovis* por IDGA, lo que se traduce en un 26,4% del total de las muestras (Sánchez *et al.*, 2006).

A nivel nacional, en la mayoría de las explotaciones ovejeras no se realizan rutinariamente pruebas diagnósticas específicas para identificar la *B. ovis*, por lo tanto no se conocen estudios válidos sobre la magnitud de la infección (Pinochet *et al.*, 1981). Con la apertura de mercados internacionales y del comercio de productos animales, existe preocupación entre los productores por el control de la infección por *B. ovis*. Por ello, se han incrementado las demandas por un diagnóstico más eficiente.

El presente trabajo tiene por objeto explorar alternativas de diagnóstico de epididimitis del carnero mediante una prueba ELISA indirecta, utilizando un antígeno lipopolisacárico rugoso obtenido de una cepa de fácil cultivo como lo es *B. abortus* RB51, ya que crece en agar *Brucella* o agar tripticasa soya y no necesita medio enriquecido ni atmósfera con CO<sub>2</sub>.



## **HIPÓTESIS**

El LPS-R de *Brucella abortus* RB51 puede ser adherido a una fase sólida para detectar anticuerpos ovinos contra *Brucella ovis* mediante una prueba de ELISA.

## **OBJETIVO GENERAL**

Establecimiento de una fase sólida con un antígeno LPS-R de *Brucella abortus* cepa RB51, para la detección de anticuerpos contra *Brucella ovis*.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1 Extracción química de LPS-R de *B. abortus* RB51.
- 2 Establecer una fase sólida con el antígeno extraído.
- 3 Detectar anticuerpos anti-*B. ovis* en ovinos mediante una ELISA indirecto.

## MATERIAL Y MÉTODO

### **Preparación del antígeno de *B. abortus* RB51**

#### **I.- Cultivo de *B. abortus* RB51 en medio líquido.**

El método de cultivo está adaptado del utilizado en el laboratorio del Prof. Ignacio Moriyón, Universidad de Navarra, España\*. La cepa de *B. abortus* se obtuvo de una vacuna comercial. Luego de restituida, se extrajo 1 mL, el cual fue disuelto en 10 mL de agua peptonada. Los medios de cultivo utilizados en esta ocasión fueron agar *Brucella* y agar tripticasa soya. Fueron sembradas 10 placas de Petri con agar *Brucella* y 10 placas con agar tripticasa soya e incubadas a 37°C por 48 h. Se realizó una tinción Gram para ver la pureza del cultivo y estos suspendidos en suero fisiológico estéril fueron sembrados en 10 tubos de agar *Brucella* tendido, que fueron incubados a 37°C por 48 horas.

Se adicionó alrededor de 5mL de suero fisiológico estéril a cada tubo y con una pipeta Pasteur se removió la superficie de cada tubo con agar con el fin de soltar los cultivos y se dejaron reposar 30 minutos. Se sembraron 5 matraces de 2 litros con 800 mL. cada uno de caldo tripticasa soya. Estos matraces fueron incubados a 37°C durante 48 hrs. en agitación orbital constante (80 r.p.m.). Luego de la incubación, se comprobó la pureza del cultivo mediante una tinción de Gram de cada matraz.

Para la cosecha de los matraces, el cultivo se distribuyó en frascos de centrifuga de 200 mL cada uno. Estos fueron centrifugados a 2500 x g a 4°C por 30 minutos, con el fin de eliminar el medio de cultivo o sobrenadante y los residuos bacteriales fueron resuspendidos en agua destilada estéril (Galanos *et al.*, 1969) y

---

\* Comunicación personal Dr. Pedro Ábalos.

centrifugados nuevamente. Este procedimiento se repitió en 3 ocasiones con el fin de eliminar el medio de cultivo y lavar completamente las bacterias.

Posteriormente, se adicionó 2,5 mL de acetona por gramo de cultivo húmedo, con el fin secar las bacterias. La suspensión de bacterias en acetona fue sometida a vacío durante tres días hasta peso constante.

## **II.- Extracción de LPS-R**

Para la extracción del LPS-R a partir de las células de *B. abortus* RB51 previamente cultivadas, se utilizó el método de Galanos (Galanos *et al.*, 1969). Brevemente, las bacterias secas son sometidas a un método de extracción química con una mezcla de éter de petróleo, cloroformo y fenol en proporciones de 8:5:3 respectivamente (256, 160 y 64 mL). La mezcla se dividió en 3 partes iguales de 160 mL. Un tercio se mezcló con 4 gr. de células secas en un matraz redondo de 1 litro y se homogenizó por 5 minutos utilizando la inmersión del matraz en un sonicador para dispersar las células secas (modificación sugerida por Dr. Klaus Nielsen, Agricultura, Canada).

La suspensión se centrifugó a 6000 x g por 30 minutos, a 4°C. Se recuperó y reservó el sobrenadante. El residuo bacteriano recobrado se mezcló con el segundo tercio de 160 mL de la mezcla de extracción y se volvió a someter al mismo proceso y el sobrenadante recuperado se unió al primero obtenido. Esto se realizó una tercera vez.

Luego el éter de petróleo y el cloroformo se removieron por evaporación en estufa a 37°C durante tres días aproximadamente hasta volumen constante del fenol residual. En este punto se agregó agua destilada al fenol para precipitar el LPS-R. Para eliminar el fenol, se sometió a diálisis la suspensión LPS-R-fenol contra agua destilada por 2 días, en agitación constante y a 4°C. Al eliminarse el fenol, dentro de bolsa de diálisis se formó un precipitado de LPS-R y este

contenido fue centrifugado a 6000 x g durante 30 minutos, a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el LPS-R fue resuspendido en 5 mL de agua destilada. Posteriormente este LPS-R fue liofilizado en el Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, en un equipo Benchop 3L (Virtis Company inc.)

### **III.- Realización de un ELISA indirecto**

#### **Establecimiento de fase sólida.**

Para la adhesión del antígeno a una placa de poliestireno se siguieron las recomendaciones de Collingwood-Selby y Toro (1992), Ábalos *et al.* (1993) y Nielsen *et al.* (1996).

Se utilizaron dos tipos de microplacas de poliestireno de 96 pocillos: NUNC Maxisorp y NUNC 69620, cuyas diferencias radican en la capacidad de adsorción de las proteínas.

Las soluciones tampón de sensibilización utilizadas para la dilución del antígeno fueron “Phosfated Buffered Saline” (PBS) pH 7,4 y tampón Carbonato-Bicarbonato pH 9,6.

El antígeno LPS-R liofilizado fue diluido en una proporción de 1mg/mL de agua destilada\* y luego fue diluido en el tampón de sensibilización obteniendo las siguientes diluciones: 1/10; 1/100; 1/1000; 1/2000, 1/5000 y 1/10000.

Las alternativas de temperaturas utilizadas en el proceso de sensibilización fueron 4°C y temperatura ambiente. Luego de esto las placas fueron congeladas hasta su uso.

---

\* Comunicación personal Dr. Carlos Robles, INTA-Bariloche, Argentina.

En el siguiente cuadro se esquematizan las 8 alternativas de sensibilización realizadas combinando el tipo de placa, tampón de sensibilización y temperaturas de incubación.

**Tabla 1: Esquema de alternativas a evaluar, usando distintos tipos de placas, tampón y T° de sensibilización**

Alternativa	Placa Maxisorb	Placa 69620	Tampón pH 7,4	Tampón pH 9,6	T° 4°C	T° ambiente
1	x		x		x	
2	x			x	x	
3	x			x		x
4	x		x			x
5		x	x		x	
6		x		x	x	
7		x		x		x
8		x	x			x

### **Desarrollo del ELISA indirecto**

Se constituyó un “pool” con 4 sueros ovinos positivos y otro de 4 sueros negativos a las pruebas de IDGA y de contrainmunolectroforesis, con el fin de tener un control positivo de campo y un control negativo de campo, para la prueba de ELISA. Estos sueros provinieron de carneros infectados naturalmente y fueron provistos por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

Además se utilizó un pool de 2 sueros de carneros experimentalmente infectados mediante la inoculación de *B. ovis*. Las vías de inoculación fueron dos: subconjuntival e intraprepucial en forma conjunta. Uno de estos carneros fue infectado con la cepa 63/290 (cepa estándar de laboratorio) y el otro fue inoculado con la cepa Til-Til (cepa aislada de campo). Se extrajo de cada animal una muestra previa a la primera inoculación, la cual fue usada como control negativo inoculado y otra muestra a los 35 días posterior a la segunda inoculación, utilizada como control positivo inoculado (positivo).

Los volúmenes de trabajo fueron de 100 uL por pocillo.

Previo a la ejecución de la prueba ELISA, las placas se descongelaron, se eliminó la dilución del antígeno y se realizó un bloqueo con el fin de eliminar reacciones inespecíficas del conjugado. Como solución de bloqueo se utilizó seroalbúmina bovina (BSA) al 0,5 % en PBS pH 7,2. Cada pocillo fue bloqueado con 100 uL de la solución durante 1 hora a 4° C y en agitación constante. Posteriormente las placas fueron lavadas tres veces con PBS/Tween 0,05%, se eliminó el resto de líquido de lavado golpeándolas sobre una toalla de papel y se distribuyeron los sueros controles positivos y negativos diluídos.

Los sueros fueron diluidos 1:50 en PBS-Tween 0,05%/EDTA 10 mM y dispensados en los respectivos pocillos. Las placas fueron incubadas en agitación a 25°C durante 1 h.

Luego de la incubación las placas fueron lavadas 4 veces con PBS/Tween 0,05% y posteriormente se adicionó un anticuerpo anti IgG-ovina conjugado a peroxidasa (Sigma) en las diluciones siguientes: 1/4000, 1/6000, 1/8000 y 1/10000 en PBS-Tween 0,05%. Se repitió un ciclo de incubación y lavado para luego adicionar el sistema sustrato- cromógeno compuesto por 1mM de ABTS (ácido (2,2'-azinobis(3-ethylbenz-thiazolinesulfónico) y 4,4mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en

tampón citrato de sodio/ácido cítrico 0,05M, pH 4,50+/- 0,05. Agregada la solución sustrato-cromógeno, se incubó esta en agitación a temperatura ambiente por 10 minutos y luego se procedió a la lectura en un equipo Immunoskan Plus BDSL, con filtro de 405 nm.

**Tabla 2: Esquema de diluciones de conjugado, antígeno y disposición de sueros en la placa**

	1/10 *	1/100 *	1/1000 *	1/2000 *	1/5000 *	1/1000*
	S/S	+ <sup>a</sup> + <sup>b</sup>	+ +	+ +	+ +	+ +
1/4000°		- <sup>c</sup> - <sup>d</sup>	- -	- -	- -	- -
1/6000°	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
	- -	- -	- -	- -	- -	- -
1/8000°	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
	- -	- -	- -	- -	- -	- -
1/10000°	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
	- -	- -	- -	- -	- -	- -

\* Diluciones del antígeno

° Diluciones del conjugado

+<sup>a</sup> pocillo con “pool” de 4 sueros positivos de campo a IDGA y contraímmunoelectroforesis.

+<sup>b</sup> pocillo con “pool” de 2 sueros positivos IDGA de carneros infectados experimentalmente

-<sup>c</sup> pocillo con “pool” de 4 sueros negativos de campo IDGA y contraímmunoelectroforesis

-<sup>d</sup> pocillo con “pool” de 2 sueros negativos a IDGA de carneros previo a la infección experimental.

Las densidades ópticas (DO) de los sueros negativos y positivos se promedió y se calculó la Razón de Absorción (RA), donde:

$$RA = \text{Promedio DO (+)} / \text{Promedio DO (-)}$$

#### **IV.- Análisis de resultados**

Para considerar válida la alternativa, el valor de RA debe ser igual o mayor a 5 (Abalos *et al.*, 1993) y el mayor valor de RA será considerado la mejor alternativa.



## RESULTADOS

Luego del cultivo de *B. abortus* cepa RB51, según el método descritos anteriormente, se logró obtener 4 g. de células secas.

Posteriormente estas células secas fueron sometidas a la extracción del LPS-R mediante el método de Galanos *et al.* (1969) y se obtuvo finalmente 0.91 g. de LPS-R seco.

La adhesión del LPS-R fue exitosa, ya que al realizar la prueba ELISA-I, hubo reconocimiento de los anticuerpos de los sueros infectados al LPS-R, por lo tanto éste se adhirió bien en ambos tipos de placas.

El bloqueo realizado con seroalbúmina bovina resultó satisfactorio, esto se expresó en los bajos valores que se obtuvieron en los valores de DO en los pocillos sin suero, correspondientes a los controles de las placas. Esto ocurrió en ambas placas con valores muy similares (Maxisorp y Nun 69620).

Para calcular la RA se utilizaron como sueros negativos los extraídos de los animales inoculados previa infección experimental y como positivos los sueros de los animales de campo. Se utilizaron estos sueros debido a la seguridad de que fuesen negativos y positivos respectivamente ya que los negativos provenían de animales nunca expuestos a la infección y los positivos eran sueros de animales de campo cuya positividad fue corroborada mediante las pruebas IDGA y contraelectroforesis.

Los sueros positivos de los animales inoculados experimentalmente presentaron bajos valores de DO, por lo tanto se sospecha de una baja seroconversión por parte de los animales.

Dentro de las diluciones de conjugado utilizadas, la que dio mejores resultados de RA fue 1/6000.

**Tabla 3: Esquema de valores de RA según tipo de placa, temperatura de sensibilización y dilución de antígeno con un conjugado de 1/6000**

	Placa a01	Placa A01 4°C	Placa A02	Placa A02 4°C	Placa B01	Placa B01 4°C	Placa B02	Placa B02 4°C
<b>Antig 1/10</b>	< 2,5	< 2,5	< 2,5	2,9	< 2,5	< 2,5	5,29	5,72
<b>Antig 1/100</b>	3,421	3,091	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5
<b>Antig 1/1000</b>	< 2,5	< 2,5	3,06	< 2,5	4,02	< 2,5	< 2,5	< 2,5

El mejor resultado se obtuvo de la placa Nunc 69620, con el “buffer” carbonato/bicarbonato, incubadas a 4° C. y con dilución del antígeno 1/10.

## DISCUSIÓN

El LPS-R de *B. abortus* RB51 comparte estructuras antigénicas con el LPS-R de *B. ovis* (Estein, 1999), por lo tanto es de esperar reconocimiento del LPS-R de RB51 como antígeno adherido a la placa de poliestireno por parte de anticuerpos generados por la exposición a *B. ovis* en carneros. Los resultados obtenidos confirman la validez de la hipótesis, ya que hubo adhesión del antígeno *B. abortus* RB51 a las placas utilizadas y reconocimiento de anticuerpos ovinos contra el LPS-R de esta cepa. Esto se corroboró con la reacción colorimétrica obtenida y los valores de DO arrojados por el equipo Immunoskan Plus.

Se utilizó la cepa RB51 de *B. abortus* porque es de fácil cultivo, ya que no exige CO<sub>2</sub>, ni medios enriquecidos como es el caso de *B. ovis* (Alton *et al.*, 1988). López *et al.* (2005) desarrollaron un ELISA-I utilizando un antígeno de *B. canis*, bacteria también de fácil cultivo y no exigente, para la detección de anticuerpos contra *B. ovis* y observaron que se obtenían resultados similares usando antígeno de *B. ovis*. Esta reacción de reconocimiento entre especies de *Brucella* sería explicada por la naturaleza de éstas, ya que al ser cepas rugosas comparten epitopos en los LPS-R con otras cepas rugosas de *Brucella*, como es el caso de *B. ovis*, *B. canis* y *B. abortus* RB51 (Moreno *et al.*, 1984).

La extracción del LPS-R de *B. abortus* RB51 fue realizada siguiendo el método de Galanos *et al.* (1969) con una modificación sugerida por el Dr. Klaus Nielsen que correspondió a una sonicación. Este paso tiene por finalidad fragmentar el consolidado de bacterias que se forma luego del proceso de secado con acetona de las mismas, favoreciendo el contacto con la mezcla y logrando mejores resultados de extracción. Este paso pudo ser crucial a la hora de la obtención del LPS-R.

Al analizar cada placa surgen datos de importancia, como las diferencias muy marcadas en los valores de DO entre los sueros según su origen.

Se observó que los sueros provenientes de animales infectados naturalmente presentaban valores de DO considerablemente mayores, algunos incluso más del doble, que los de animales infectados experimentalmente y totalmente aislados. Esta diferencia estaría dada por la exposición reiterada al patógeno por parte de los animales de campo, mientras que los animales infectados experimentalmente sólo tuvieron el contacto con la bacteria al inocularlos. Además se observó que en la primera exposición experimental de los animales infectados, la producción de anticuerpos, detectada mediante la prueba de inmunodifusión en gel de agar, fue muy pobre. Se realizó una segunda inoculación y los sueros analizados en este trabajo corresponden a los extraídos 35 días post segunda inoculación. Las cepas utilizadas en la inoculación presentan diferencias en origen y antigenicidad, pues la cepa estándar, mantenida en laboratorio por largo tiempo, puede tener atenuada su antigenicidad y la cepa 'Til Til', que es de campo, puede tener una mayor antigenicidad y virulencia.

Otro antecedente a considerar es la cantidad de bacteria inoculada, ésta puede haber sido insuficiente. Esto explicaría la pobre respuesta en la primera inoculación y la necesidad de una segunda. También podría ser determinante en los valores de DO, que resultaron mucho menores comparadas a las DO de los sueros de animales positivos de campo.

Los sueros extraídos previa inoculación en los animales infectados experimentalmente, presentaban valores de DO muy similares a los controles de conjugado, ya que nunca estuvieron expuestos a la bacteria, por ello se utilizó su DO para calcular la RA, como verdadero negativo; mientras que los negativos de los animales de campo eran superiores, en algunos casos más altos o muy cercanos a los positivos inoculados. Esto puede explicarse debido a que la prueba

ELISA es más sensible que la inmunodifusión en gel de agar y estos sueros sean falsos negativos. También puede ser que estos animales hayan desarrollado anteriormente la infección y estén en la fase crónica de la enfermedad con títulos de anticuerpos más bajos, no detectados por la inmunodifusión.

Las placas con mejores resultados correspondieron a las Nunc 69620 y el tampón de sensibilización carbonato/bicarbonato. El efecto de la temperatura de incubación de las placas en etapa de sensibilización fue contradictorio, lo esperado son mayores valores de DO en las placas sensibilizadas a temperatura ambiente, ya que esta influye en el movimiento de las partículas, por lo tanto a mayor temperatura, mayor movimiento y mejor adhesión del antígeno LPS-R a la placa de poliestireno. No hubo mayores diferencias en el tipo de placa que dio el mejor resultado, no así en las otras placas donde la temperatura de sensibilización menor (4°C) dieron mayores valores de DO.

La dilución del antígeno que dio mejor resultado fue la más baja (1/10). Esto podría ser debido a que la cantidad de LPS-R extraído de *B. abortus* cepa RB51 mediante el método de Galanos, fue limitada y al diluir más lo obtenido, se adhirió menor cantidad de LPS-R a la placa de ELISA y existió baja reacción antígeno-anticuerpo. En el caso del conjugado, la dilución que arrojó mejores resultados fue 1/6000, valor esperado por lo recomendado por los fabricantes del conjugado.

Estos resultados son concordantes con otros trabajos que desarrollan ELISA-I y eligen estas alternativas en sus estudios (Robles *et al.*, 1990; Ábalos *et al.*, 1996; López *et al.*, 2005 y 2006; Nielsen *et al.*, 1996)

## CONCLUSIONES

- Es recomendable el uso de la cepa *B. abortus* RB51 para la obtención de LPS-R, pues esta cepa es de más fácil cultivo que otras cepas rugosas de *Brucella* de las cuales se obtiene el mismo antígeno (*B. ovis* o *B. canis*).
- Los anticuerpos de animales infectados por *B. ovis* son detectados mediante el antígeno LPS-R, obtenido desde *B. abortus* RB51.
- La mejor alternativa de obtención de una fase sólida para ELISA referente a tipo de placa, temperatura y “buffer” de sensibilización son similares a los utilizados por diferentes autores independientemente del antígeno.

## **BIBLIOGRAFÍA**

**ÁBALOS P.; IBARRA L.; PINOCHET L.; NAVIA F.; BOSIER X.** 1996. Residual anti-*Brucella abortus* Strain 19 antibodies detected in adult cattle by two indirect-Elisa tests. Vet. Rec. 138: 140.

**ÁBALOS P.; PINOCHET L.; FÁBREGA F.** 1993. Desarrollo de una prueba de ELISA para descartar respuestas postvacunales con Cepa 19, utilizando un antígeno soluble polisacárido de *Brucella abortus* 1119-3. Av. Cs. Vet. 8(2):138-143.

**AJAI C.O., COOK J.E, DENNIS S.M.** 1980. Diagnosis ovine epididymitis by immunofluorescence. Vet. Rec. 107: 421.

**ALTON G.G., JONES L.T., ANGUS R.D., VERGER J.M.** 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. INRA. París, pp. 157-168.

**ARÉVALO A.** 2004. Determinación de la brucelosis ovina en predios de la XI Región. Memoria de Título Médico Veterinario, Valdivia, Chile. Fac. Cs. Veterinarias. Universidad Austral de Chile. 26 p.

**BAGUES M., BARBERÁN M., MARÍN C., BLASCO J.** 1995. The *Brucella abortus* RB51 vaccine does not confer protection against *Brucella ovis* in rams. Vaccine. 13(3): 301-304.

**BLASCO J., MARÍN C., BARBERÁN M., MORIYÓN I., DÍAZ R.** 1987. Immunization with *Brucella melitensis* REV-1 against *Brucella ovis* infection in rams. Vet. Microbiol. 14: 381-392.

**BLASCO J. M.** 1990. *Brucella ovis*. **In:** Animal Brucellosis. Nielsen K. and Duncan J.R., Editors. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp. 352-368.

**BUDDLE M. B., BOYES B.V.** 1953. A *Brucella* mutant causing genital disease of sheep in New Zealand, Aust. Vet. J. 29: 145.

**BULGIN M.** 1990. *Brucella ovis* epizootic in virgin rams lambs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 196: 1120-122.

**BULGIN M. S., ANDERSON B. C.** 1983. Association of sexual experience with isolation of various bacteria in cases of ovine epididymitis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 182. 372-374.

**BULGIN M.S., BRUSS M.L., ANDERSON B.C.** 1990. Methods for control of lamb epididimitis in large purebred flock. J. Am. Vet. Med. Assoc. 196: 1110-1115.

**CAMERON R., LAUERMAN L.**1976. Characteristics of semen changes during *Brucella ovis* infection in rams. Vet. Rec. 99: 231-233.



**CHILE. INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICAS (INE).** 1997. VI Censo Nacional Agropecuario. (En línea).

[http://www.ine.cl/ine/canales/chile\\_estadistico/home.php](http://www.ine.cl/ine/canales/chile_estadistico/home.php) (Consultado 30-11-2006).

**CHILE. MINISTERIO NACIONAL DE AGRICULTURA (MINAGRI).** 2006. Alistan primer centro biotecnológico de reproducción ovina del país. (En línea)

<http://www.minagri.gob.cl/noticias/detallenoticia.php?noticia=2245>  
(Consultado 30-11-2006).

**CHILE. MINISTERIO NACIONAL DE AGRICULTURA (MINAGRI).** 2006. INIA realizó estudio sobre el potencial ovino nacional. (En línea)

<http://www.minagri.gob.cl/noticias/detallenoticia.php?noticia=2135>  
(Consultado 30-11-2006).

**CHILE. OFICINA DE ESTUDIOS Y POLÍTICAS AGRARIAS (ODEPA).** 2005. Comercio exterior, exportaciones (En línea)

<http://www.odepa.gob.cl/odepaweb>. (Consultado 29-12-2006).

**COLLINGWOOD-SELBY A.; TORO H.** 1992. Virus bronquitis infecciosa aviar unido a fase sólida para detección de anticuerpos específicos en pruebas de ELISA. Av. Cs. Vet. 7(2):218-222.

**DUBRAY G., PLOMMET M.** 1976. Structure et constituants des *Brucella*: propriétés biologiques et caractérisation des fractions. Dev. Biol. Standard. 31: 68-91.

**ESTEIN S. M.** 1999. Aspectos inmunológicos en el diagnóstico y control de la epididimitis contagiosa del carnero por *Brucella ovis*. Arch. Med. Vet. 31(1): 5-17.

**GALANOS C., LÜDERITZ O., WESTPHAL O.** 1969. A new method for the extraction of R lipopolysaccharide. Eur. J. Biochem.9: 245-249.

**GARCÍA CARRILLO, C., A. CUBA CAPARÓ, D.M. MYERS.** 1974. Susceptibilidad comparada de cabritos y carneros a la infección causada por *Brucella ovis*. Estudios serológicos, bacteriológicos y patológicos. Gac. Vet. 36: 355-374.

**HOMSE A.C., CASARO A.P., CAMPERO C.M.** 1995. Infertilidad en ovejas por *Brucella ovis*. Vet. Arg. 12:243-249.

**LÓPEZ G., AYALA S., ESCOBAR G., LUCERO N.** 2005. Use of *Brucella canis* antigen for detection of ovine serum antibodies against *Brucella ovis*. Vet. Microbiol. 105: 181-187.

**LÓPEZ G., ESCOBAR G., AYALA S., LUCERO N.** 2006. Detection of antibodies to *Brucella ovis* in sheep milk using *B. ovis* and *B. canis* antigen. Vet. Microbiol. 116: 232-238.

**LOPETEGUI P.** 1997. Vacuna RB51 en la erradicación de brucelosis bovina en Chile. Tecno Vet. Año 3 (3), 26-28.

**MACKINNON D., DÍAZ J.** 1969. Causas de eliminación de carneros corriedale en la Provincia de Magallanes, Chile. Boletín Técnico de la Ganadera Tierra del Fuego S.A. 4: 1-11.

**MANAZZA J.** 2004. Examen clínico-reproductivo del carnero. INTA Balcarce. (En línea).

<http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/ganaderia/ovinos/carneros.htm> (Consultado 28-11-2006).

**MANTEROLA L.; TEJERO-GARCÉS A.; FICAPAL A.; SHOPAYEVA G.; BLASCO J. M.; MARÍN C. M.; LÓPEZ-GOÑI I.** 2003. Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in semen samples from rams. Vet. Microbiol. 92 (1); 65-72.

**MARÍN C.M., JIMENEZ DE BAGUES M.P., BARBERÁN M., BLASCO J.M.** 1989. Efficacy of long-acting oxytetracycline alone or in combination with streptomycin for treatment of *Brucella ovis* infection of rams. J. Am. Vet. Med. Assoc. 50: 560-563.

**MC FARLANE D., SALISBURY R.M., OSBORNE H.V., JEBSON J.L.**

1952. Investigation into sheep abortion in New Zealand during 1950 lambing season. Aust. Vet. J. 28: 221-226.

**MERCY A.; ROBERTSON G.; GOULDER R.; MC KENZIE A.** 1985. The prevalence of ovine brucellosis in cull merino rams in Western Australia. Aust. Vet. J. 62; 137-138.

**MEYER M.E.** 1982. *Brucella ovis*. In: Handbuch der bakteriellen infektionen bei tiernen. Blobel and Scheleba. Jena. Germany. 182 p.

**MORENO E.; JONES L.; BERMAN D.** 1984. Immunochemical characterization of rough *Brucella* lipopolysaccharides. Infect. Immun. 43: 779-782.

**MUÑOZ P., ESTEVAN M., MARÍN C., DE MIGUEL M., GRILLÓ M., BARBERÁN M., IRACHE J., BLASCO J., GAMAZO C.** 2006. *Brucella* outer membrana complex-loades microparticles as a vaccine against *Brucella ovis* in rams. Vaccine 24: 1897-1905.

**NIELSEN K.; GALL D.; KELLY W.; VIGLIOCCO A.; HENNING D.; GARCÍA M.** 1996. Indirect Immunoassays. In: Immunoassays Development: Application to Enzime Immunoassays for the Diagnosis of Brucellosis. Agriculture and Agri-Food. Ontario, Canada. pp. 5.1-7.7.

**NÚÑEZ F., CONCHA O., ÁBALOS P.** 1986. Prevalencia de brucelosis caprina en la comuna de San José de Maipo. Av. Cs. Vet. 1: 81-86.

**OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE)** 2000. Ovine epididymitis (*Brucella ovis*). Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. Chapter 2.4.1. Fourth Edition. Paris, France, pp. 467-473.

**ORELLANA M.** 1982. Brucelosis ovina: modificaciones de algunas características del semen de carnero, producidas por la infección experimental con *Brucella ovis*. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Fac. Cs Veterinarias y Pecuarias. Medicina Veterinaria. 56 p.

**PAOLICCHI F.; TERZOLO H.; MALENA R.; MORSELLA C.** 1991. Estudio comparativo de medios de cultivo para aislar *Brucella ovis*. Rev. Arg. Microbiol. 23: 155-159.

**PAOLICCHI F.; BARTOLOMÉ J.; PATITUCCI A.; SOLANET C.; CAMPERO C.** 1992. Seguimiento clínico, serológico y bacteriológico en carneros naturalmente infectados con *Brucella ovis*. Rev. Med. Vet. 73: 46-52.

**PÉREZ P.** 2005. Características de la producción ovina y caprina mundial. Santiago. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias Departamento de Fomento de la Producción Animal. 17p. (Apunte docente)

**PINOCHET L.; SÁNCHEZ M. L.; ÁBALOS P.** 1981. Brucelosis. Mon. Med. Vet. 3(2): 44; 72-80.

**PINOCHET L., PINTO A., SÁNCHEZ M., BERTOLINO M.** 1987. Brucelosis ovina. Vacunación con cepa 45/20 adyuvante. Av. Cs. Vet. 2 (1): 47-50.

**ROBLES C.; URCULLU J.; UZAL F.** 1990. Primer diagnóstico en Patagonia de orquioepididimitis en carneros por Bacilos Pleomórficos Gram Negativos. Vet. Arg. 7:453-455.

**ROJAS X., ALONSO O., ROSENFELD C., URIBE C., FERNANDEZ V., TADICH N.** 1990. Brucelosis ovina. Situación nacional en explotaciones pequeñas de una comuna del sur de Chile. Arch. Med. Vet. XXII (1): 55-64.

**SÁNCHEZ M.; MATAMALA, L.; BORIE C.; MORALES M.** 2006. Estudio descriptivo de diagnósticos del Laboratorio de Microbiología Clínica de la Universidad de Chile. Panvet. XX° Congreso Panamericano de Ciencias Veterinaria/ 14° Congreso Chileno de Medicina Veterinaria. 12-16 Noviembre, Santiago de Chile.

**SIMMONS G.; HALL W.** 1953. Epididymitis in rams. Aust. Vet. J. 29: 33-40.

**WEBB R.; QUINN C.; COCKRAM F.; HUSBAND A.** 1980. Evaluation of procedures for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. Aust. Vet. J. 56; 172-175