



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

VALIDACIÓN DE UN ELISA INDIRECTO CON ANTÍGENO
CITOSÓLICO DE *Brucella abortus* RB51, PARA LA DETECCIÓN
DE ANTICUERPOS CONTRA *Brucella ovis* EN OVINOS

KARINA TERESA SAADI SIU

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

PROFESOR GUÍA: PEDRO ABALOS PINEDA

SANTIAGO, CHILE
2014



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

VALIDACIÓN DE UN ELISA INDIRECTO CON ANTÍGENO
CITOSÓLICO DE *Brucella abortus* RB51, PARA LA DETECCIÓN
DE ANTICUERPOS CONTRA *Brucella ovis* EN OVINOS

KARINA TERESA SAADI SIU

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

NOTA FINAL:

FIRMA

PROFESOR GUÍA : PEDRO ABALOS PINEDA

PROFESOR CORRECTOR: PATRICIO RETAMAL MERINO

PROFESOR CORRECTOR: GALIA RAMÍREZ TOLOZA

SANTIAGO, CHILE

2014

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, César Saadi, Fresia Siú y Teresa Rodríguez, por acompañar cada uno de mis pasos con tanto amor y dedicación y por todo el esfuerzo que han puesto siempre en mi formación académica. A mis hermanas, Claudia Aguilar y Paula Aguilar, por el inmenso cariño y apoyo incondicional que me han entregado, dándome la fuerza para seguir adelante. A mis tíos, Antonio Raffo, Enrique Siú y Naldy Jofré, por estar presentes cada vez que los he necesitado.

Al Dr. Pedro Ábalos, mi profesor guía, por la inmensa paciencia, apoyo y enseñanza que siempre me ha entregado, por permitirme aprender de él durante este proceso y por entregarme las herramientas necesarias para poder llevar a cabo esta etapa llena de nuevos desafíos.

Al Dr. Patricio Retamal, por estar siempre presente, atento y dispuesto a entregar sus conocimientos y por permitirme acudir a él cada vez que me surgían dudas.

A la Dra. Galia Ramírez, por el constante apoyo que me otorgó durante este proceso.

Al Dr. Carlos Robles del INTA-Bariloche de Argentina, al Dr. Rigofredo Veneros del SAG de Punta Arenas y al Dr. Fernando Squella del INIA-Rayentué de Hidango por brindarnos toda su ayuda, colaboración y contribución en la realización de esta Memoria.

A mis compañeros de laboratorio, a quienes les tengo un profundo cariño, en especial a Andrés Lazo, que se transformó en un apoyo fundamental en el desarrollo de mi Memoria y a Marcela Fresno, por todo lo que me ha ayudado en este proceso.

A Paty Álvarez, por toda su entrega y constante preocupación por nuestro bienestar y desempeño en el Departamento de Medicina Preventiva.

A Don Patricio Toledo y a Carlos Campos, que siempre estuvieron dispuestos a ayudarnos.

A mis amigos de la vida, especialmente a Vale Tapia, Vane Nieto, Astrid Standen, Betzy Montt, Caro Beato, Daniel Díaz y Pipe Reyes, que sin su compañía y cariño todo este camino no habría sido el mismo.

MEMORIA DE TÍTULO

“VALIDACIÓN DE UN ELISA INDIRECTO CON ANTÍGENO CITOSÓLICO DE *Brucella abortus* RB51, PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA *Brucella ovis* EN OVINOS”

“VALIDATION OF AN INDIRECT ELISA WITH CYTOSOLIC ANTIGEN OF *Brucella abortus* RB51 FOR THE DETECTION OF ANTIBODIES AGAINST *Brucella ovis* IN SHEEP”.

Karina Teresa Saadi Siú *

*Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

RESUMEN

En el presente estudio se describe el desarrollo y validación de un Ensayo inmunoenzimático indirecto (ELISA-I) para el diagnóstico serológico de la infección por *Brucella ovis* (*B. ovis*) en ovinos, utilizando proteínas citosólicas de *Brucella abortus* RB51 (*B. abortus* RB51) como antígeno. Se probaron dos tipos de placas de poliestireno, NUNC 69620 y NUNC Maxisorp, dos tampones de sensibilización de diferente pH con dos alternativas de conjugado, el anticuerpo monoclonal anti IgG-caprino/ovino (Sigma A9452) y la proteína G (Sigma P81170). Las concentraciones óptimas de antígeno citosólico, sueros y conjugados fueron determinadas mediante titulación del tipo *checkerboard*. Para la validación del ensayo se utilizaron 55 sueros de ovinos considerados como infectados/expuestos, positivos a examen clínico, a un ELISA-I comercial, a la fijación del complemento (FC) y a la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y 338 sueros de ovinos no infectados, provenientes de un rebaño ovino libre de infección, negativos a la prueba de FC. El punto de corte diagnóstico fue determinado a través del método de las características del tipo receptor-operador (ROC). El ELISA-I desarrollado con anticuerpo monoclonal como conjugado mostró mejores valores de sensibilidad (90,9%) y especificidad (95,9%). Estos resultados, a pesar de ser significativos, son deficientes para ser considerados de utilidad diagnóstica y lograr un adecuado control de la infección en rebaños ovinos. La baja sensibilidad obtenida al utilizar proteínas citosólicas como antígeno estaría relacionada con la escasa exposición al antígeno y la corta memoria inmunológica que generarían este tipo de proteínas en un animal infectado.

Palabras claves: ELISA-I, *B. ovis*, antígeno citosólico, *B. abortus* RB51, anticuerpo monoclonal.

ABSTRACT

In the present study, by using cytosolic proteins of *Brucella abortus* RB51 (*B. abortus* RB51) as antigen, the development and validation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (I-ELISA) for the serological diagnosis of *Brucella ovis* (*B. ovis*) in sheep is described. Two types of polystyrene microplates, NUNC 69629 and NUNC

Maxisorp, two different types of coating buffers with two different conjugates, the murine monoclonal anti goat/sheep IgG (Sigma A9452) and the protein G (Sigma P81170), were evaluated. Optimal concentrations of cytosolic antigen, sera and conjugates were determined by a checkerboard titration. The assay was validated using 55 sera from infected/exposed rams, positive to clinical examination, a commercial I-ELISA, the complement fixation test (CFT) and the polymerase chain reaction (PCR) test and 338 sheep serums from a flock free from infection, negative to CFT. The diagnostic cut-off was determined by the methodology of Receiver-Operator Characteristic (ROC). The I-ELISA using monoclonal antibody as conjugate showed the best values of sensitivity (90, 9%) and specificity (95, 9%). In spite of this significant results, are weak enough to be considered a real alternative for the diagnosis and control of the infection in sheep flocks. The low sensitivity reached using cytosolic proteins as antigen would be related to the limited exposure and the short immunological memory generated by these proteins in the infected animal.

Key words: I- ELISA, *B. ovis*, cytosolic antigen, *B. abortus* RB51, monoclonal antibody.

INTRODUCCIÓN

La Epididimitis del Carnero (EC) es una enfermedad infectocontagiosa crónica causada por la bacteria *Brucella ovis* (*B. ovis*), que afecta de forma exclusiva a los ovinos, especialmente a los carneros y sus tejidos reproductivos (Blasco, 1990) y que es considerada la causa más común de epididimitis infecciosa en los ovinos (Gall *et al.*, 2003). Su importancia radica en el efecto productivo que genera en las explotaciones ovinas, el cual se debe a las lesiones crónicas que produce en los machos, siendo las más importantes la epididimitis y la orquitis, que finalmente deterioran la calidad del semen, provocando una disminución en la fertilidad y en la vida productiva de los carneros. Además puede producir abortos esporádicos, aumento de la mortalidad perinatal, y consecuentemente, una disminución de la eficiencia productiva del rebaño (Robles, 2008; Carvalho Júnior *et al.*, 2012).

B. ovis es una bacteria cocobacilar Gram-negativa, intracelular facultativa, perteneciente al género *Brucella* (Robles, 2008). Posee una envoltura celular constituida por una membrana externa, una membrana interna y un espacio periplásmico intermedio, en donde existen proteínas y un peptidoglicano, responsable de la forma e integridad osmótica de la bacteria. Su citoplasma es rico en ADN, ARN y proteínas citosólicas, importantes desde el punto de vista diagnóstico (Estein, 2006).

En la membrana externa se encuentran dos grupos de antígenos mayores: el lipopolisacárido rugoso (LPS-R) y las proteínas de membrana externa (PME). El LPS-R le confiere la característica de formar colonias rugosas debido a que carece del polisacárido O presente en las cepas lisas de *Brucella* (Estein, 1999).

Los antígenos internos de *B. ovis*, conformados por las proteínas periplásmicas y las proteínas citosólicas, son muy conservados entre las distintas especies del género *Brucella* (Goldbaum *et al.*, 1992; Kittelberger *et al.*, 1995; Baldi *et al.*, 1999). Entre las proteínas citosólicas con características inmunogénicas que han sido identificadas están, las proteínas del estrés térmico: GroEL, GroES, DnaK, HtrA; las proteínas Yajc, UvrA; la bacterioferritina (BFR); la gliceraldehído-3- fosfato deshidrogenasa (GAPDH); y las proteínas ribosomales, L7/L12 y cp24 (Estein, 2006).

B. ovis presenta antigenicidad cruzada con otras brucelas rugosas tales como *Brucella canis* (*B. canis*) y *Brucella abortus* cepa RB51 (*B. abortus* RB51), debido al LPS-R (Escobar *et al.*, 2010). Esta similitud antigénica es considerada una ventaja para el desarrollo de pruebas serológicas para el diagnóstico de brucelas rugosas, ya que estas cepas podrían ser utilizadas indistintamente como antígeno (López *et al.*, 2005).

B. ovis posee una epidemiología diferente al resto de las especies del género *Brucella*, debido a que la EC es una enfermedad no-zoonótica, de transmisión principalmente venérea, en donde los carneros juegan un rol fundamental en la diseminación de la enfermedad, siendo el semen la principal fuente de infección dentro de los rebaños (Robles, 2008). El contagio entre machos se produce comúnmente por convivencia (Estein, 1999), por estar en contacto directo unos con otros generando conductas por dominancia como la copulación rectal, lamidos y contacto nasal con semen infectado (Ridler *et al.*, 2014). Las hembras poseen relativa resistencia a la infección, sin embargo, pueden actuar en forma pasiva como vector mecánico de la infección durante el período de encaste (Robles, 2008), cuando machos se aparean con hembras inmediatamente después de que estas se han apareado con un macho infectado (Ridler *et al.*, 2014). Por lo tanto, la transmisión carnero-carnero y carnero-oveja-carnero serían mecanismos determinantes de infección (OIE, 2008).

Para evitar la introducción de carneros infectados al rebaño se han implementado medidas de control basadas en la identificación y eliminación de los animales con epididimitis clínica o positivos a las pruebas serológicas de diagnóstico, sin embargo, la EC ha sido difícil de controlar y constantemente se están desarrollando nuevas alternativas que permitan llegar a un diagnóstico certero (Robles, 2008).

La palpación testicular de los carneros como método de diagnóstico clínico, a pesar de ser una técnica simple y rápida, no es lo suficientemente sensible, porque no todos los animales infectados desarrollan una epididimitis palpable (Blasco, 1990) y posee una baja especificidad, porque existen otros microorganismos capaces de generar epididimitis clínica en los ovinos, como la denominada Epididimitis de los Corderos causada por *Actinobacillus seminis*, *Haemophilus somnus* e *Histophilus ovis* - que a diferencia de *B. ovis*, son microorganismos que infectan a animales más jóvenes y sin experiencia sexual- y

también la epididimitis causada por *Actinomyces pyogenes* o *Corynebacterium pseudotuberculosis*, todas ellas indiferenciables de la producida por *B. ovis* mediante la palpación (Arévalo, 2004).

Por lo anterior, se requiere del método bacteriológico para llegar a un diagnóstico definitivo, lo que implica el aislamiento del agente a partir de semen, testículo afectado, glándulas anexas, placentas infectadas o fetos abortados (López *et al.*, 2005). No obstante, este es un procedimiento poco práctico para ser realizado en una gran cantidad de animales y un método poco eficiente, debido a que la infección es de carácter crónico y el animal infectado elimina la bacteria en forma intermitente a través de sus secreciones; además, conlleva exigentes condiciones para realizar su cultivo, pues la incubación de *B. ovis* se debe realizar en un medio selectivo, bajo una atmósfera de 10 a 20% de CO₂ durante al menos siete días antes de dar un cultivo como negativo (Robles, 2008).

Ante esto, las pruebas de diagnóstico serológico surgen como una alternativa más eficiente para identificar carneros infectados por *B. ovis* dentro del rebaño, siendo un elemento esencial en los programas de control de la EC y las preferidas para realizar un diagnóstico rutinario de la enfermedad, destacándose la fijación del complemento (FC), la inmunodifusión en gel de agar (IDGA) y el ensayo inmunoenzimático (ELISA) (López *et al.*, 2005). La FC es la única prueba prescrita por la OIE y la Unión Europea para el comercio internacional (OIE, 2008). Sin embargo, al igual que la IDGA, la FC posee una sensibilidad menor que la prueba de ELISA (López *et al.*, 2005).

La prueba de ELISA se destaca por su eficiencia y fácil estandarización, además de permitir el procesamiento de gran número de muestras simultáneamente, convirtiéndose especialmente el ELISA indirecto (ELISA-I) en el potencial candidato para ser aplicado en el diagnóstico serológico de *B. ovis* (López *et al.*, 2005). Entre sus ventajas destaca el que puede ser automatizada y adaptada a muestreos de gran escala, requiriendo una mínima cantidad de reactivos (López *et al.*, 2005; Álvarez *et al.*, 2007) y, dependiendo de las características del antígeno o del tipo de conjugado utilizado en su desarrollo, podría alcanzar una alta sensibilidad y especificidad (Gall *et al.*, 2003; Daltro de Oliveira *et al.*, 2011).

Las pruebas de ELISA basadas en antígenos de superficie, como las PME de *Brucella*, presentan reacciones cruzadas con otras bacterias de los géneros *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, *Rhizobium* y *Agrobacterium*, que pertenecen a la familia *Rhizobiaceae* (Estein *et al.*, 2002). Al utilizar un antígeno más purificado como el LPS-R, no se observan los inconvenientes de las PME para la detección de anticuerpos contra *B. ovis*, sin embargo, se han observado reacciones cruzadas entre el LPS-R de *B. ovis* y el LPS-R de *Ochrobactrum anthropi*, las que han podido ser controladas utilizando otro tipo de conjugado en una versión de ELISA-I desarrollado por Gall *et al.* (2003).

Para enfrentar los inconvenientes de las pruebas de ELISA-I basadas en antígenos de superficie, se ha descrito el uso de antígenos internos de *Brucella* como proteínas inmunogénicas para el desarrollo de una posible alternativa de diagnóstico (Estein *et al.*, 2002).

La utilidad diagnóstica de las proteínas citoplasmáticas ha sido demostrada en diferentes especies del género *Brucella* (Estein *et al.*, 2002). En el caso de *B. canis*, los antígenos citosólicos pueden proporcionar pruebas para el diagnóstico serológico más sensibles y específicas que las basadas en antígenos de membrana externa (Daltro de Oliveira *et al.*, 2011). Los antígenos citosólicos de *B. abortus* han sido exitosamente aplicados en pruebas de ELISA-I para el diagnóstico específico de brucelosis humana activa (Goldbaum *et al.*, 1992) y de brucelosis en el ganado bovino, pudiendo diferenciar animales infectados de aquellos vacunados con *B. abortus* S19 o infectados con *Yersinia enterocolitica* 0:9 (Baldi *et al.*, 1996). Además, estos antígenos pueden proporcionar pruebas con alta sensibilidad para el diagnóstico de *Brucella melitensis* (*B. melitensis*) en ovejas (Estein *et al.*, 2002).

Para lograr un adecuado control de la EC se requiere de una prueba de diagnóstico validado que presente una alta eficiencia y permita reflejar las condiciones epidemiológicas de la población en la que será aplicada (Uzal *et al.*, 1995).

Con la finalidad de contribuir al control de la infección por *B. ovis*, el presente trabajo busca generar una alternativa de diagnóstico serológico para la EC en ovinos del país mediante el desarrollo y validación de un ELISA-I basado en antígenos citosólicos, obtenidos desde *B. abortus* RB51, para la detección de anticuerpos contra *B. ovis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

A. Implementación de una prueba de ELISA-I con antígeno citosólico

1. Antígeno citosólico de *B. abortus* RB51

El antígeno citosólico de *B. abortus* RB51 fue preparado en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina e Instituto de Salud Tropical de la Universidad de Navarra, España.

El procedimiento para la obtención del antígeno citosólico de *B. abortus* RB51 se realizó según el método expuesto por Aragón *et al.* (1996) con algunas modificaciones¹, en donde, una vez realizado el cultivo de *B. abortus* RB51 se obtiene una solución concentrada de bacterias que es suspendida en una solución salina fosfatada (PBS) 10nM, pH 7,2 y pasada dos veces por una prensa *French* (Pressure Cell 40K Aminco; SML Instruments Inc, Urbana, Illinois) a una presión de 30.000 Kg/cm², para lograr romper las células bacterianas. Luego, el homogeneizado obtenido es digerido por nucleasas (50µg de DNAsa II tipo V y RNAsa A por 48 horas a 4°C) y ultracentrifugado a 40.000 x g. El sobrenadante obtenido es dializado en agua destilada por 24 horas y posteriormente liofilizado. El antígeno citosólico de *B. abortus* RB51 liofilizado fue reconstituido en agua destilada a una concentración base de 1 mg/mL y se almacenó a temperatura de congelación (-20° C).

Este antígeno posee un 65% de proteína total en base a peso seco, determinado por análisis de *Lowry* (Retamal, 1998) y las fracciones que lo constituyen corresponden principalmente a las proteínas Cu-Zn superóxido dismutasa (Cu-Zn SOD) del periplasma bacteriano y a Yajc, GroEL y GroES, provenientes del citoplasma celular².

2. Establecimiento de la fase sólida

Para obtener la adhesión del antígeno citosólico a la placa de poliestireno y determinar la alternativa que ofreciera las condiciones óptimas para el establecimiento de la fase sólida,

¹ Comunicación personal Dr. Pedro Ábalos.

² Comunicación personal Dr. Gerhardt Schurig.

se siguieron las recomendaciones de Ábalos *et al.* (1993), Nielsen *et al.* (1996) y Crowther (2001). Se probaron dos tipos de placas de poliestireno de 96 pocillos, NUNC 69620 y NUNC Maxisorp, con dos tampones de sensibilización diferentes para la dilución del antígeno, solución salina fosfatada (PBS) 0,01M, pH 7,4 +/- 0,20 y solución carbonato/bicarbonato 0,05M, pH 9,6 +/- 0,05 en concentraciones de 1:50 (20µg/mL), 1:100 (10µg/mL) y 1:200 (5µg/mL), utilizando dos alternativas de temperatura de sensibilización, de refrigeración (4°-6°C) y de laboratorio (18°-22°C), durante 18 a 24 horas.

Una vez realizada la sensibilización de las placas por el antígeno, se realizó un bloqueo con el fin de eliminar reacciones inespecíficas del conjugado, probando dos alternativas de solución de bloqueo, la leche descremada al 3% y la albúmina sérica bovina (BSA) en PBS al 3%, a temperatura de refrigeración (4°- 6°C) y en agitación constante durante una hora.

Al mismo tiempo se probaron en las placas dos tipos de conjugado: el anticuerpo monoclonal de ratón anti IgG-caprino/ovino conjugado a peroxidasa (Sigma A9452) y la proteína G conjugada a peroxidasa (Sigma P81170), diluidos en PBS con 0,05% de Tween-20 (PBS-T) en una concentración de 1:5000, 1:10.000 y 1:15000 para el primero; y 1:250, 1:500 y 1:1000 para el segundo.

En esta etapa se utilizaron como sueros controles un *pool* de 10 sueros de carneros infectados como control positivo (+) y un *pool* de 10 sueros de carneros provenientes de un rebaño libre de infección como control negativo (-); los que fueron probados en duplicado en concentraciones de 1:50, 1:100 y 1:200 en PBS-T/EDTA-EGTA 10 mM.

Las concentraciones óptimas de antígeno citosólico, sueros y conjugados fueron determinadas mediante titulación del tipo *checkerboard* para cada tipo de placa, tampón y temperatura de sensibilización. El criterio que se utilizó para seleccionar las mejores alternativas fue la denominada Razón de Absorción (RA), que corresponde a la razón entre el promedio de las densidades ópticas (OD) de los sueros positivos y negativos utilizados en esta etapa. Se consideraron útiles aquellas combinaciones con una RA mayor o igual a 4 (Crowther, 2001), siendo finalmente seleccionada aquella alternativa que ofreció una RA mayor a 4, que permiten optimizar el uso de los reactivos, y en donde, la OD del suero control positivo (+) fuera cercana a 1,000.

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

3. Desarrollo de la prueba de ELISA-I

Para cada una de las alternativas previamente mencionadas, el desarrollo de la técnica de ELISA-I con antígeno citosólico se realizó bajo las siguientes condiciones (FAO/IAEA, 1993):

El volumen de trabajo en todas las etapas fue de 100uL por cada pocillo de la placa.

Una vez realizada la sensibilización de la placa con el antígeno, ésta fue sometida a un proceso de lavado con solución de lavado, PBS con 0,05% de Tween-20 (PBS-T), mediante un lavador de placas manual Immunowash NUNC para luego ser bloqueada con la solución de bloqueo e incubada por una hora a 4°C, en agitación constante.

Posteriormente, se realizó un ciclo de tres lavados con PBS-T, para poder agregar las diluciones de suero en PBS-T/EDTA-EGTA 10 mM que fueron incubados por una hora a 37°C, en agitación constante.

Tras otro ciclo de tres lavados con PBS-T, cada uno de los conjugados fue añadido en sus respectivas diluciones en PBS-T e incubado por una hora a 37°C, en agitación constante.

Luego, y tras un último ciclo de tres lavados con PBS-T, fue adicionado el sistema sustrato-cromógeno compuesto por 1mM de ABTS (ácido 2,2'-azino bis (3-ethyl-benzthiazoline sulfónico)) y 4,4 mM de H₂O₂ en tampón citrato de sodio/ácido cítrico 0,05M, pH 4,5 +/- 0,05, que se dejó reaccionar por 15 minutos a 37°C, en agitación constante, para luego detener la reacción enzimática mediante una solución al 4% de sodio dodecil sulfato (SDS) y realizar la lectura de las reacciones.

Finalmente la lectura de las absorbancias se realizó en un equipo INMUNSKAN Plus (BDSL), con un filtro de 405 nm, que entrega los resultados en valores de densidad óptica (OD).

B. Validación de la prueba de ELISA-I con antígeno citosólico

1. Sueros:

Para validar la alternativa de ELISA-I seleccionada en la etapa anterior, fueron sometidos a ella los siguientes grupos de sueros:

1.a. Sueros positivos: Conformado por 55 sueros de ovinos considerados infectados/expuestos a *B. ovis*, con signos clínicos, positivos a un *kit* de ELISA comercial detector de anticuerpos y a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en muestras de semen, que corresponden a sueros recolectados en Punta Arenas y confirmados en el Laboratorio Regional del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), para el cálculo de la sensibilidad de la prueba.

1.b. Sueros negativos: Conformado por 338 sueros de ovinos considerados negativos/no expuestos a *B. ovis*, sin signos clínicos, provenientes de un rebaño ovino certificado libre de infección y negativos a la prueba de FC, que corresponden a sueros obtenidos desde el rebaño ovino del Centro Experimental Hidango, del INIA-Rayentué, para el cálculo de la especificidad de la prueba.

1.c. Sueros control: Se utilizaron los mismos sueros control de la primera etapa de desarrollo de la prueba de ELISA-I. Como control positivo (+), el *pool* de 10 sueros positivos, provenientes de sueros de los animales de Punta Arenas y controles (+) de *kits* de ELISA diagnósticos; y como control negativo (-) se utilizó el *pool* de 10 sueros negativos, provenientes del rebaño ovino de Hidango y de controles (-) de *kits* ELISA diagnósticos.

Todos los sueros fueron probados en duplicado y para su evaluación se obtuvo el promedio de sus dos lecturas de OD.

2. Interpretación de las lecturas

Para comparar a todos los sueros en una misma base, las OD obtenidas fueron transformadas en porcentajes de positividad (PP). Así, el control positivo de la respectiva placa fue considerado como base para tal efecto, cuyo valor al ser expresado en PP corresponde al 100%.

$$PP = [OD \text{ Suero Problema} / OD \text{ Suero Control (+)}] \times 100$$

3. Análisis de los resultados

Finalmente, los PP de todos los sueros probados fueron analizados a través del método de las características del tipo receptor-operador (ROC), mediante el programa MedCalc, para obtener como resultado el punto de corte diagnóstico o *cut-off* que determinara el mejor nivel de sensibilidad y especificidad de la prueba, dando un equilibrio en el menor número de falsos positivos (+) y falsos negativos (-) (OIE, 2009). Los sueros con PP iguales o superiores al *cut-off* fueron considerados positivos y aquellos menores al *cut-off*, negativos.

RESULTADOS

A. Implementación de una prueba de ELISA-I con antígeno citosólico

En el establecimiento de la fase sólida, la placa NUNC 69620 mostró mejores niveles de adsorción y fijación del antígeno citosólico, siendo seleccionado como tampón de sensibilización el tampón PBS 0,01M, pH 7,4 +/-0.20, con el cual se obtuvo mejores RA en todas las placas, alcanzando una RA de 5,46.

La dilución óptima de antígeno fue de 1:100, que corresponde a una concentración de 10µg/mL de proteína. Mientras que, la temperatura de sensibilización que permitió obtener alternativas consideradas como válidas fue la temperatura de refrigeración (4-6°C) por 18-24 horas.

El bloqueo de las placas sensibilizadas resultó satisfactorio, permitiéndonos disminuir las OD obtenidas en los sueros controles negativos a valores muy cercanos a 0,100, en contraste con los valores de OD observados en estos sueros al no realizar este procedimiento, en donde éstos no bajaban de 0,400. Se seleccionó como mejor alternativa el bloqueo realizado con leche descremada al 3%, debido a que nos permitió disminuir de mejor manera el *background* presente en los sueros controles negativos, otorgándonos las menores OD promedio (0,121) en comparación a las obtenidas con BSA en PBS al 3% (0,173), al menor costo y tiempo de incubación posible.

La dilución de sueros seleccionada fue de 1:50 en PBS-T/EDTA-EGTA.

Para cada uno de los conjugados utilizados, la dilución que entregó los mejores resultados fue de 1:15000 para el anticuerpo monoclonal de ratón anti IgG-caprino/ovino conjugado a peroxidasa (Sigma A9452) y de 1:1000 para la proteína G conjugada a peroxidasa (Sigma P81170), alcanzando una RA de 5,15 y 4,08, respectivamente. Estos resultados obtenidos mediante titulación del tipo *checkerboard* se encuentran esquematizados en la Tabla 1.

Tabla 1: Esquema final de titulación del tipo *checkerboard* para la implementación de la prueba de ELISA-I con antígeno citosólico de *B. abortus* RB51 para cada uno de los conjugados utilizados, anticuerpo monoclonal (C*Mon.) y proteína G (P.G.), con sus respectivos valores de Razón de Absorción (RA) como criterio de selección de las mejores alternativas.

Placa Nunc 69620	Ag Citosólico 1/50 PBS	Ag Citosólico 1/50 PBS	Ag Citosólico 1/100 PBS	Ag Citosólico 1/100 PBS
	Suero 1/50	Suero 1/100	Suero 1/50	Suero 1/100
C*Mon. 1/15.000 (Bloqueo Leche)	RA: 4,07		RA: 5,15	
C*Mon. 1/15.000 (Bloqueo BSA)		RA: 4,13		RA: 4,37
P.G. 1/1.000 (Bloqueo Leche)		RA: 4,00	RA: 4,08	
P.G. 1/1.000 (Bloqueo BSA)				

B. Validación de la prueba de ELISA-I con antígeno citosólico

El resultado obtenido en el ELISA-I desarrollado con antígeno citosólico de *B. abortus* RB51 para cada uno de los conjugados utilizados, expresado a través de los promedios de PP en los sueros ovinos infectados y no infectados se aprecian en la Figura 1.

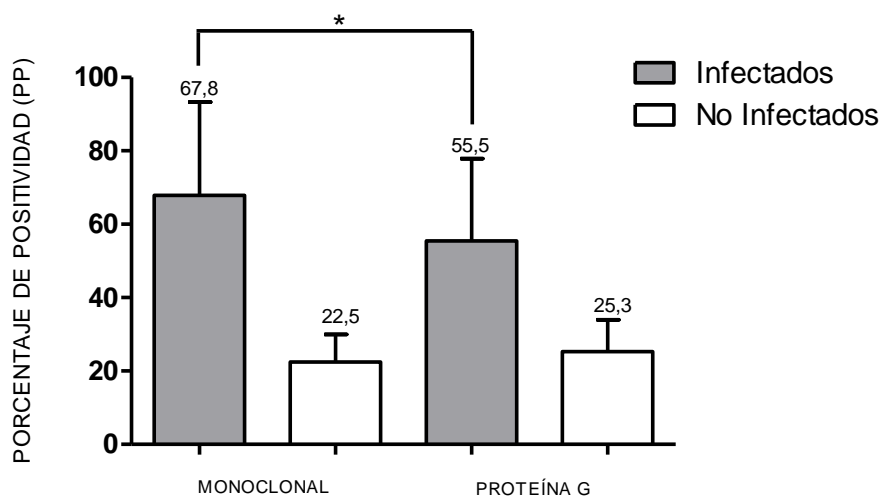


Figura 1: Promedio de Porcentajes de Positividad (PP) para la prueba de ELISA-I con antígeno citosólico de *B. abortus* RB51, desarrollada con anticuerpo monoclonal anti IgG-caprino/ovino y

proteína G, en 55 sueros de ovinos infectados/expuestos y 338 sueros de ovinos no infectados/no expuestos. Los datos representan el PP promedio para cada uno de los grupos de sueros analizados y su desviación estándar. * $p < 0,0001$.

B.1. Resultados del ELISA-I con antígeno citosólico de *B. abortus* RB51 desarrollado con anticuerpo monoclonal de ratón anti IgG-caprino/ovino conjugado a peroxidasa (Sigma A95452)

El *cut-off* entregado por el método ROC, mediante el programa MedCalc, para la prueba de ELISA-I desarrollada con anticuerpo monoclonal como conjugado fue un PP de 35,5%, así, cuando el PP de los sueros fue igual o superior a 35,5% se les consideró como positivos a la prueba de ELISA-I y si el promedio de PP fue menor a 35,5%, se les calificó como negativos a ella.

La distribución de frecuencias de los PP para los grupos de sueros positivos y negativos utilizando el punto de corte seleccionado se aprecia en la Figura 2. Mediante este valor de *cut-off* se obtuvo una sensibilidad de 90,9% y una especificidad de 95,9%.

La representación de la curva de ROC se muestra en la Figura 3.

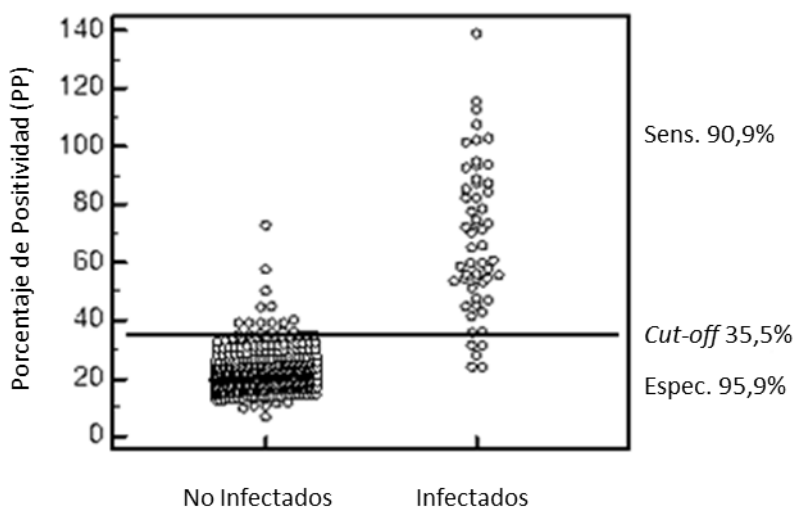


Figura 2: Distribución de frecuencias de Porcentajes de Positividad (PP) para sueros de ovinos no infectados/no expuestos y sueros de ovinos infectado/expuestos a *Brucella ovis* a la prueba de ELISA-I con antígeno citosólico de *B. abortus* RB51 desarrollada con anticuerpo monoclonal como conjugado. Con un PP de 35,5% como *cut-off* para la prueba desarrollada se obtuvo una especificidad de 95,9% con 338 sueros de ovinos no infectados y una sensibilidad de 90,9% con 55 sueros de ovinos infectados. $p < 0,0001$.

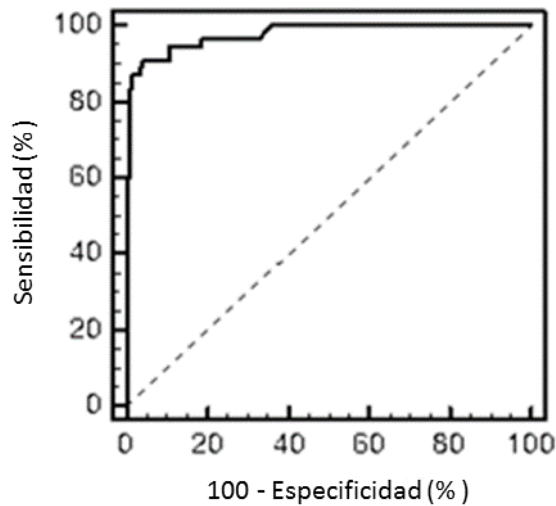


Figura 3: Representación de la curva del análisis ROC de los Porcentajes de Positividad (PP) de los grupos de sueros no infectados/no expuestos e infectados/expuestos a *Brucella ovis* a la prueba de ELISA-I con antígeno citosólico de *B. abortus* RB51 desarrollada con anticuerpo monoclonal como conjugado.

B.2. Resultados del ELISA-I con antígeno citosólico de *B. abortus* RB51 desarrollado con proteína G conjugada a peroxidasa (Sigma P81170)

El *cut-off* establecido mediante el programa MedCalc, a través del método ROC, fue un PP de 39,3% para la prueba de ELISA-I desarrollada con proteína G como conjugado, y respecto de este valor de PP los sueros fueron calificados como positivos o negativos a la prueba. La distribución de los valores de PP se encuentra representada en la Figura 4.

Con los valores determinados, se obtuvo una sensibilidad de 81,8% y una especificidad de 95,6%.

La representación de la curva de ROC para la proteína G se aprecia en la Figura 5.

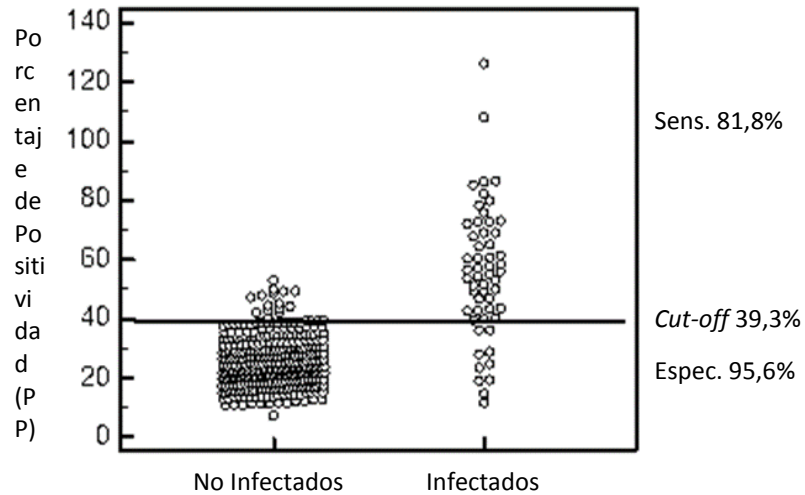


Figura 4: Distribución de frecuencias de Porcentajes de Positividad (PP) para los sueros de ovinos no infectados/no expuestos y sueros de ovinos infectado/expuestos a *Brucella ovis* a la prueba de ELISA-I con antígeno citosólico de *B. abortus* RB51 desarrollada con proteína G como conjugado. Con un PP de 39,3% como *cut-off* para la prueba desarrollada se obtuvo una especificidad de 95,6% con 338 sueros de ovinos no infectados y una sensibilidad de 81,8% con 55 sueros de ovinos infectados. $p < 0,0001$.

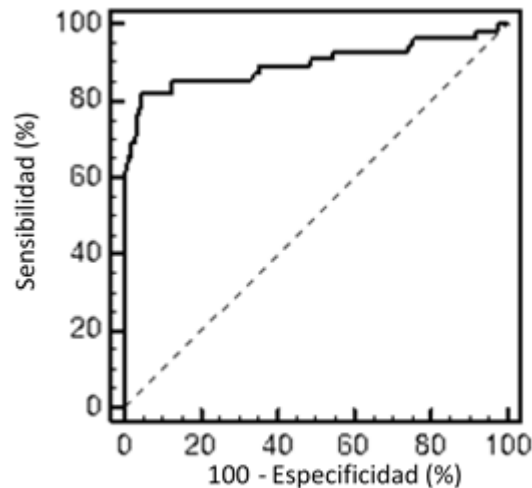


Figura 5: Representación de la curva del análisis ROC de los Porcentajes de Positividad (PP) de los grupos de sueros no infectados/no expuestos e infectados/expuestos a *Brucella ovis* a la prueba de ELISA-I con antígeno citosólico de *B. abortus* RB51 desarrollada con proteína G como conjugado.

DISCUSIÓN

Los métodos de diagnóstico serológico desarrollados para detectar la infección por *B. ovis* están basados generalmente en la detección de anticuerpos frente a antígenos de membrana externa, siendo el más utilizado el antígeno LPS-R debido a su capacidad de generar una respuesta inmune humoral rápida y elevada (Gall, 2003; Nielsen *et al.*, 2004; López *et al.*, 2005). Ante esto, y con la finalidad de evaluar el desempeño de los antígenos citosólicos, que son altamente específicos y muy conservados dentro del género *Brucella* (Estein, 2006), el objetivo de este estudio fue desarrollar una prueba de ELISA-I para el diagnóstico serológico de *B. ovis* con antígeno citosólico de *B. abortus* RB51, que de acuerdo a los datos obtenidos por diversos estudios realizados en otras especies del género, han podido generar pruebas de utilidad diagnóstica (Goldbaum *et al.*, 1992; Baldi *et al.*, 1996; Estein *et al.*, 2002; Daltro de Oliveira *et al.*, 2011).

Se decidió utilizar la cepa RB51 de *B. abortus* debido a que presenta antigenicidad cruzada con cepas rugosas del género *Brucella*, que además de ser una cepa más segura que *B. canis* es de fácil obtención, y más fácil de cultivar que *B. ovis* (Retamal, 1998; Marambio, 2007).

En una primera etapa, se logró establecer una fase sólida con antígeno citosólico de *B. abortus* RB51, el cual se adhirió de mejor manera a la placa NUNC 69620, considerada como una placa con una baja capacidad de adsorción de proteínas según el fabricante. La concentración óptima de antígeno se determinó en 10µg/mL de proteína, la que se encuentra dentro del rango recomendado en otros estudios (Kemeny 1992; Retamal 1998), en donde se evitaría el desarrollo de uniones inestables entre las proteínas adsorbidas y el consiguiente sesgo en la interpretación de resultados. En concordancia con las recomendaciones existentes para este tipo de antígeno, se estableció que los antígenos citosólicos requieren de una sensibilización con tampón PBS 0,01M, pH 7,4 +/-0.20 a temperatura de refrigeración durante 18-24 horas (Retamal, 1998), a diferencia de los antígenos lipopolisacárido liso (LPS-S) y LPS-R, que necesitan del tampón carbonato/bicarbonato a pH 9,6 +/- 0.05 para el establecimiento de la fase sólida (Ábalos *et al.*, 1993).

Previo a la realización de la técnica se efectuó un bloqueo de placas para evitar uniones inespecíficas del conjugado debido a que el antígeno citosólico, a diferencia de otros antígenos, no se adhiere uniformemente al pocillo de la placa dejando sitios libres de unión en la superficie (Crowther, 2001). Las dos alternativas de bloqueo utilizadas en este estudio resultaron satisfactorias, siendo seleccionada la leche descremada al 3% por permitirnos obtener las densidades ópticas más bajas en los sueros ovinos negativos, otorgándonos un menor *background* a un bajo costo y en el menor tiempo de incubación posible.

Debido al elevado *background* presente en los sueros ovinos negativos/no expuestos de *B. ovis*, se decidió probar dos alternativas de conjugado: el anticuerpo monoclonal de ratón anti IgG-caprino/ovino conjugado a peroxidasa (Sigma A9452) y la proteína G conjugada a peroxidasa (Sigma P81170), que de acuerdo a lo establecido por los estudios de Gall *et al.* (2003) y Marín *et al.* (1998) han permitido reducir las reacciones inespecíficas y por ende, remover en gran medida la reactividad de los sueros de animales no infectados a favor de la especificidad de la prueba de diagnóstico. Esto, pudo observarse en este estudio, ya que se logró obtener elevados valores de especificidad con las dos alternativas de conjugado utilizadas, siendo éstos muy similares en ambos casos.

Se utilizó el método de ROC para poder seleccionar el *cut-off* que nos permitiera obtener la mejor combinación de valores de sensibilidad y especificidad para la prueba con el menor porcentaje de error total (Greiner *et al.*, 2000). Siendo seleccionado para el ELISA-I desarrollado con anticuerpo monoclonal como conjugado un PP de 35,5% como *cut-off*, con el cual se obtuvo una sensibilidad de 90,9% y una especificidad de 95,9%. Mientras que, para la prueba desarrollada con proteína G como conjugado este valor fue de un PP de 39,3%, obteniéndose una sensibilidad de 81,8% y una especificidad de 95,6%.

En contraste con estudios previos en donde la utilización de antígeno citosólico permitía generar pruebas de ELISA-I con alta sensibilidad en el diagnóstico de *B. canis* (Daltro de Oliveira *et al.*, 2011) y de *B. melitensis*, se obtuvo una baja sensibilidad en la prueba de ELISA-I desarrollada con antígeno citosólico de *B. abortus* RB51 en comparación con otras pruebas para detectar la infección por *B. ovis* en ovinos (Estein *et al.*, 2002).

La baja sensibilidad obtenida con los antígenos citosólicos para el diagnóstico de *B. ovis* estaría relacionada con la necesidad de un estímulo antigénico apropiado, con un procesamiento de antígenos y señales co-estimuladoras adecuadas para poder generar una respuesta humoral contra proteínas citosólicas de la bacteria (Estein *et al.*, 2002), lo que podría verse reflejado en la baja cantidad de anticuerpos generados contra este tipo de antígeno en algunos sueros de animales infectados ó en la baja persistencia de éstos tras la infección.

Por ende, los carneros infectados estarían siendo expuestos a los antígenos intracelulares de la bacteria solo en etapas agudas o iniciales de infección, cuando ésta llega al tracto reproductivo y entra en una fase proliferativa de infección (Chin y Pang-Turner, 1990). Por lo que, los anticuerpos dirigidos contra antígenos citosólicos estarían siendo producidos solo durante una etapa activa de infección y luego caerían a niveles no detectables (Goldbaum *et al.*, 1992; Kittelberger *et al.*, 1995), debido a que probablemente la respuesta a este tipo de antígenos posee una memoria inmunológica pobre o de corto plazo, pudiendo haber generado un importante número de falsos negativos a la prueba de ELISA-I desarrollada, a diferencia de los anticuerpos contra antígenos de membrana externa que persistirían por más tiempo tras la recuperación de la infección (Baldi *et al.*, 1996).

Al evaluar la eficiencia diagnóstica de la prueba de ELISA-I desarrollada con ambos conjugados, encontramos diferencias en cuanto a los valores de sensibilidad, siendo la alternativa desarrollada con el anticuerpo monoclonal de ratón anti IgG-caprino/ovino conjugado a peroxidasa (Sigma A9452), la que obtuvo el mejor desempeño como una posible prueba de diagnóstico para *B. ovis*.

Sin embargo, a pesar de haber logrado estandarizar el protocolo de la prueba de ELISA-I para el diagnóstico de *B. ovis* con mejores resultados que los obtenidos por la validación realizada por Álvarez *et al.* (2007) en el país, en donde se alcanzaron valores de 82,9% y 91,4%, para sensibilidad y especificidad, y que los presentados por Estein *et al.* (2002), en donde se obtuvo una sensibilidad de 67,1% y una especificidad de 95,8% para la prueba desarrollada con proteínas citosólicas; éstos valores son deficientes como para ser considerados de utilidad diagnóstica para la EC, ya que la condición epidemiológica de la población ovina objetivo de este estudio posee una alta prevalencia de la enfermedad, por

lo que se requiere de una prueba de diagnóstico con una alta sensibilidad para poder controlar efectivamente la infección por *B. ovis* en los rebaños (Praud *et al.*, 2012).

Consecuentemente, al tomar la FC como prueba de diagnóstico de referencia para la EC, la mejor sensibilidad se ha logrado con pruebas de ELISA-I utilizando antígenos de membrana externa (96,2%), mientras que la mejor especificidad (96,6%) se ha alcanzado con la IDGA y la prueba de ELISA-I con antígeno LPS-R (Estein *et al.*, 2002). Siendo además la prueba de ELISA-I la que posee la mejor capacidad para detectar animales infectados en etapas tempranas de infección, entre 19-36 días tras haber sido expuestos a *B. ovis*, haciéndola una de las pruebas serológicas más apropiadas para los programas de control y eliminación de la infección junto con la FC (Ridler *et al.*, 2014).

Finalmente, la utilización de antígeno citosólico en el desarrollo de pruebas de ELISA-I entrega resultados significativos pero bajos en comparación con antígenos de membrana externa, no haciéndolos recomendables para el diagnóstico de *B. ovis*.

BIBLIOGRAFÍA

- **ÁBALOS, P.; PINOCHET, L.; FÁBREGA, F.** 1993. Desarrollo de una prueba ELISA para descartar respuesta postvacunales con Cepa 19, utilizando un antígeno soluble polisacárido de *Brucella abortus* 1119-3. Av. Cs. Vet. 8(2):139-143.
- **ÁLVAREZ, J.; VENEROS, R.; GONZÁLEZ, O.** 2007. Validación operacional de un ELISA comercial para *Brucella ovis*, Chile. Arch. Med. Vet. 39:275-279.
- **ARAGON, V.; DIAZ, R.; MORENO, E.; MORIYON, I.** 1996. Characterization of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* Native Haptens as Outer Membrane O-Type Polysaccharides Independent from the Smooth Lipopolysaccharide. J. Bacteriol. 178: 1070-1079.
- **AREVALO, S.** 2004. Determinación de brucelosis ovina (*Brucella ovis*), en predios de la Undécima Región de Chile. Memoria de Título Médico Veterinario. Valdivia, Chile. U. Austral de Chile. Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 31 p.
- **BALDI, P.; GIAMBARTOLOMEI, G.; GOLDBAUM, F.; ABDON, L.; VELIKOVSKY, C.; KITTELBERGER, R.; FOSSATI, C.** 1996. Humoral Immune Response against Lipopolysaccharide and Cytoplasmic Proteins of *Brucella abortus* in Cattle Vaccinated with *B. abortus* S19 or Experimentally Infected with *Yersinia enterocolitica* Serotype 0:9. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 4(3): 472-476.
- **BALDI, P.; ARAJ, G.; RACARO, G.; WALLACH, J.; FOSSATI, C.** 1999. Detection of Antibodies to *Brucella Cytoplasmic* Proteins in the Cerebrospinal Fluid of Patients with Neurobrucellosis. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 6(5): 756-759.
- **BLASCO, J. M.** 1990. *Brucella ovis*. In: Animal Brucellosis. Nielsen K. and Duncan J.R., Editors. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. pp. 352-358.
- **CARVALHO JUNIOR C.; MOUSTACAS V.; XAVIER M.; COSTA E.; SILVA T., PAIXAO T.; BORGES A.; GOUVEAI A.; SANTOS R.** 2012. Andrological, pathologic, morphometric, and ultrasonographic findings in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. Small Ruminant Res. 102:213-222.
- **CHIN, J.; PUNG-TURNER, B.** 1990. Profiles of Serological Reactivity against Cytosoluble Antigens of *Brucella ovis* in Experimentally Infected Rams. J. Clin. Microbiol. 28(2): 2647-2652.
- **CROWTHER, J.R.** 2001. The ELISA Guidebook. Humana Press Inc. 999 Riverview Drive, Suite 208. Totowa, New Jersey USA. 421 p.
- **DALTRO DE OLIVEIRA M.; VALE, V.; KEID, L.** 2011. Validation of an ELISA method for the serological diagnosis of canine brucellosis due to *Brucella canis*. Res. Vet. Sci. 90: 425-431.

- **ESCOBAR, G.; BOERI, E.; AYALA, S.; LUCERO, N.** 2010. The feasibility of using antigens prepared with rough *Brucella* strains for diagnosis of canine brucellosis. *Rev. Argent. Microbiol.* 42: 35-40.
- **ESTEIN, S.** 1999. Aspectos inmunológicos en el diagnóstico y control de la epididimitis contagiosa del carnero por *Brucella ovis*. *Arch. Med. Vet.* 31(1): 5-17.
- **ESTEIN, S.** 2006. Brucelosis: Inmunidad y vacunación (revisión bibliográfica). [en línea]. *Revista electrónica de Veterinaria Redvet.* 2(5): 1-25 <
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050506.html> >
 [consulta: 24-03-2014]
- **ESTEIN, S.; BALDI, P.; BOWDEN, A.** 2002. Comparison of serological tests based on outer membrane or internal antigens for detecting antibodies to *Brucella ovis* in infected flocks. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14: 407-411.
- **FAO/IAEA.** 1993. Brucellosis ELISA kit manual. **In:** Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. Agriculture Laboratory. Animal Production and Health Section. Seibersdorf, Austria. 35 p.
- **GALL, D.; NIELSEN, K.; VIGLIOCCO, A.; SMITH, P.; PEREZ, B.; ROJAS, X.; ROBLES, C.** 2003. Evaluation of an indirect enzyme-linked immunoassay for presumptive serodiagnosis of *Brucella ovis* in sheep. *Small Rumin. Res.* 48: 173-179.
- **GOLDBAUM, F.; RUBBI, C.; WALLACH, J.; MIGUEL, S.; BALDI, P.; FOSSATI, C.** 1992. Differentiation between active and inactive human brucellosis by measuring antiprotein humoral immune responses. *J. Clin. Microbiol.* 30: 604-607.
- **GREINER M.; PFEIFFER D.; SMITH R.D.** 2000. Principles and practical application of the receiver operating characteristic (ROC) analysis for diagnostic tests. *Prev. Vet. Med.* 45: 23-41.
- **KEMENY, D.M.** 1992. Titration of antibodies. *J. Immunol. Methods.* 150: 57-76.
- **KITTELBERGER, R.; HILBINK, F.; HANSEN, M.; PENROSE, M.; DE LISLE, G.; LETESSON, J.; GARIN-BASTUJI, B.; FOSSATI, C.; CLOECKAERT, A.; SCHIRIG, G.** 1995. Serological crossreactivity between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* 0:9 immunoblot analysis of the antibody response to *Brucella* protein antigens in bovine brucellosis. *Vet. Microbiol.* 47: 257-270.
- **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.

- **MARAMBIO, C.** 2007. Establecimiento de una fase sólida con un antígeno LPR-R de *Brucella abortus* Cepa RB51, para la detección de anticuerpos contra LPS-R de *Brucella ovis*. Memoria de Título de Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile. Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 43 p.
- **MARÍN C.M.; ALONSO-URMENETA B.; MORIYÓN I.; PÉREZ-GÓMEZ, S.; BLASCO J.M.** 1998. Comparison of polyclonal, monoclonal and protein G peroxidase conjugates in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella ovis* in sheep. *Vet. Rec.* 143: 390-394.
- **NIELSEN, L.; GALL, D.; KELLY, W.; VIGLIOCCO, A.; HENNING, D.; GARCIA, M.** 1996. Immunoassays Development: Application to enzyme Immunoassays for the diagnosis of Brucellosis. Agriculture and Agri-Food. Ontario, Canada. 216 p.
- **NIELSEN K.; SMITH P.; CONDE S.; DRAGUI DE BENITEZ G.; GAL, D.; HALBERT G.** 2004. Rough lipopolysaccharide of *Brucella abortus* RB51 as a common antigen for serological detection of *B. ovis*, *B. canis*, and *B. abortus* RB51 exposure using indirect enzyme immunoassay and fluorescence polarization assay. *J. Immunoassay Immuchem.* 25:171-82
- **OIE. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES.** 2008. World Organization for Animal Health. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres. 4º edición. Capítulo 2.7.9: Epididimitis ovina (*Brucella ovis*). [en línea] < <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-terrestre/acceso-en-linea/> > [consulta: 24-03-2014]
- **OIE. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES.** 2009. World Organization for Animal Health. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres. 4º edición. Capítulo 1.1.2: Principios de validación para las pruebas de diagnóstico de enfermedades. [en línea] < [http://web.oie.int/esp/normes/fmanual/pdf_es/1.1.2 Principios de validacion.pdf](http://web.oie.int/esp/normes/fmanual/pdf_es/1.1.2_Principios_de_validacion.pdf) > [consulta: 01 -04-2014]
- **PRAUD A.; CHAMPION J.; CORDE Y.; DRAPEAU A.; MEYER L.; GARIN-BASTUJI B.** 2012. Assessment of the diagnostic sensitivity and specificity of an indirect ELISA kit for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *BMC Vet. Res.* 8: 68.
- **RIDLER A.; SMITH S.; WEST D.** 2014. Seroconversion and semen shedding in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. *N. Z. Vet. J.* 62 (1): 47-50.
- **RETAMAL, P.** 1998. Detección de anticuerpos mediante ELISA indirecto con antígeno citosólico de *Brucella abortus* RB51 en bovinos adultos y vacunados con cepa RB51 y cepa 19. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 59 p.

- **ROBLES, C.** 2008. Brucelosis en carneros por *Brucella ovis*. 1a ed. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - INTA, EEA Bariloche, Argentina. 27 p.
- **UZAL F.; ÁBALOS P.; PADILLA F.; ROJAS X.; DAJER A.; SILVA M.; NIELSEN K.; WRIGHT P.** 1995. Evaluation of an indirect ELISA kit for the diagnosis of bovine brucellosis in Latin America. Arch. Med. Vet. XXVII (N° ext.): 59-63.