



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

**VALIDACIÓN DE UN ELISA PARA LA DETECCIÓN DE
ANTICUERPOS ANTI *Brucella ovis* EN OVINOS, UTILIZANDO
ANTÍGENO LPS-R DE *B. abortus* RB51**

ANDRÉS ALEJANDRO LAZO ESCOBAR

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

NOTA FINAL:

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA	: PEDRO ABALOS P
PROFESOR CORRECTOR	: PATRICIO RETAMAL M.
PROFESORA CORRECTORA	: BETTY SAN MARTIN N

SANTIAGO, CHILE
2014



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

**VALIDACIÓN DE UN ELISA PARA LA DETECCIÓN DE
ANTICUERPOS ANTI *Brucella ovis* EN OVINOS, UTILIZANDO
ANTÍGENO LPS-R DE *B. abortus* RB51**

ANDRÉS ALEJANDRO LAZO ESCOBAR

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

PROFESOR GUÍA: PEDRO ABALOS PINEDA

UNIVERSIDAD DE CHILE

SANTIAGO, CHILE
2014

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por su gran sacrificio que realizaron día a día para darme las herramientas, con las cuales he logrado terminar mi etapa universitaria.

A María de los Ángeles, por su gran amor, cariño y apoyo incondicional.

A mis amigos de toda la vida, Américo Rojas, Julio Valenzuela y Miguel Moraga, con quienes siempre puedo confiar y sé que estarán siempre a mi lado.

Al Dr. Pedro Abalos, por su apoyo durante la memoria, donde nunca me sentí solo y siempre conté con su apoyo, al igual que al Dr. Patricio Retamal, quien siempre aclaro mis dudas en el laboratorio.

Al Dr. Rigofredo Veneros SAG-Punta Arenas. Por sus consejos, hospitalidad y su ayuda en la realización de esta memoria.

Al Dr, Carlos Robles Inta-Bariloche, Argentina, por la ayuda brindada en esta Memoria.

Al Dr. Fernando Squella INIA Rayantue, por su colaboración en la memoria

A mis compañeros de laboratorio, especialmente a Karina Saadi Siu, Una gran amiga quien me brindo su colaboración, compañía y alegría en mi Memoria.

Al personal del departamento, en especial a Don Patricio Toledo y a Patricia Álvarez

RESUMEN

En el presente trabajo se desarrolló y validó un ensayo inmunoabsorbente ligado a un enzima (ELISA), usando antígeno lipopolisacárido rugoso (LPS-R) de la cepa RB51 de *Brucella abortus* para el diagnóstico de infección con *B. ovis* en ovinos. Se probaron 2 tipos de placas de poliestireno NUNC 69620 y Maxisorp, 2 tipos de tampones de distinto pH con 2 diferentes conjugados: policlonal anti IgG-ovina (Sigma A3415) y monoclonal anti IgG-caprino/ovino (Sigma A9452), las diluciones del antígeno y del conjugado del trabajo se obtuvieron mediante una titulación en tablero de ajedrez. El ensayo se validó utilizando la placa NUNC 69620 con una sensibilización del antígeno 1:50 en el tampón carbonato-bicarbonato y el uso del conjugado monoclonal, en 55 sueros de ovinos positivos a examen clínico y a la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y 338 sueros de ovinos provenientes de un rebaño libre de la enfermedad, confirmados por medio de fijación del complemento (FC). Para comparar las placas, las densidades ópticas (DO) fueron llevadas a porcentajes de positividad (PP), el punto de corte fue un 39,5% utilizando la metodología "Receiver-Operator Characteristic" (ROC), estimando la sensibilidad y la especificidad en un 92.7% y un 98,5% respectivamente. Estos resultados permiten establecer que el ELISA desarrollado sea una alternativa real, para el diagnóstico serológico de *B. ovis* en el país.

Palabras claves: *B.abortus* CRB51, ELISA, LPS-R, *B. ovis*, Conjugado monoclonal

ABSTRACT

The present work aims to develop and validate an enzyme immunoassay (ELISA) using rough lipopolysaccharide antigen (LPS- R) of the *Brucella abortus* strain RB51 for the diagnosis of ram epididymitis. The evaluated alternatives were 2 types of polystyrene NUNC microplates 69620 and Maxisorp with 2 different conjugates were tested: polyclonal anti sheep IgG (Sigma A3415) and monoclonal anti IgG-goat/sheep (Sigma A9452) dilutions of antigen and conjugate were obtained by a checkerboard titration. The assay was validated using the NUNC microplates 69620 with antigen sensitization 1:50 in carbonate - bicarbonate buffer and the use of monoclonal conjugate in 55 sera from ram positives to clinical examination and testing polymerase chain reaction (PCR) and 338 sheep serums from a herd free from the disease, confirmed by complement fixation (CF). To compare the

plates the optical densities (OD) were taken at percentages of positivity (PP). The cut off was 39.5% using the methodology Receiver -Operator Characteristic (ROC), estimating the sensitivity and specificity 92.7 % and 98.5 % respectively. These results establish that the developed ELISA is a real alternative for the diagnosis of *B.ovis* in the country.

Key Words: *B. abortus* SRB51, ELISA, LPS-R, *B. ovis*

INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad infecto-contagiosa de distribución mundial y de carácter zoonótico (Seleem *et al.* 2010). Actualmente se considera una enfermedad reemergente y constituye una causa importante de pérdidas económicas en el ganado ovino. Representando un problema de salud pública en muchos países en vías de desarrollo, especialmente en países del sur de Europa, Sudamérica y Asia. Se reconocen 9 especies distintas de *Brucella*; siete de ellas afectan a animales terrestres, *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae* y *B. microti*, y dos infectan a mamíferos marinos, *B. ceti* y *B. pinnipedialis* (Pappas, 2010). La mayoría de ellas se caracteriza por incidir sobre los aspectos reproductivos de los animales causando epididimitis y orquitis en machos; endometritis, placentitis y abortos en las hembras, y usualmente se presenta con infertilidad en ambos sexos (Seleem *et al.*, 2010).

La brucelosis en ovinos es producida por *Brucella ovis* y se denominada Epididimitis ovina. Es una enfermedad infecciosa de curso crónico, que produce problemas clínicos o subclínicos, se manifiesta con epididimitis y orquitis en los carneros y esporádicamente placentitis en las ovejas. El efecto productivo de esta enfermedad en las explotaciones ovinas se manifiesta en una disminución en la fertilidad y la vida productiva de los carneros, abortos esporádicos, aumento de la mortalidad perinatal y la consecuente baja de los rendimientos de carne y lana por hectárea (Blasco, 1990; Robles, 2008).

Brucella ovis, es una bacteria cocobacilar Gram (-), intracelular facultativa; presenta una envoltura celular constituida por una membrana interna, una externa y un espacio periplásmico. En la membrana externa de su pared celular se encuentran dos grupos de antígenos mayores: el lipopolisacárido rugoso (LPS-R) y las proteínas de membrana externa (PME); ambos presentan epítomos accesibles a los anticuerpos, ya que no existe el impedimento estérico de la cadena O del lipopolisacárido presente en las cepas lisas de *Brucella* (Blasco, 1990; Estein, 1999).

El LPS-R es una molécula compleja y de bajo peso molecular compuesta por el lípido A y un núcleo constituido por oligosacáridos de glucosa, manosa y el 2-ceto-3-desoxioctonato (KDO). Este último se encuentra en mayor proporción en *B. ovis* con respecto del resto de

las especies de *Brucella* (Afzal *et al.*, 1984). Por otro lado, en el lípido A y en el núcleo existen epítomos compartidos con cepas rugosas de otras brucelas, pero *B. ovis* posee epítomos específicos de *B. ovis* (Estein, 1999).

B. ovis a diferencia del resto de las especies del género no afecta al ser humano, infectando de forma exclusiva a los ovinos, siendo los machos más susceptibles que las hembras (Estein, 1999; Tsolis *et al.*, 2009). Por otro lado, la raza Merino sería más resistente a la infección que las razas británicas y sus cruza, en condiciones de explotación similares (Arévalo, 2004)

A diferencia de *B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis* y *B. canis* en las que la hembra juega un rol importante en la trasmisión, en la epididimitis ovina es el macho el que juega un papel preponderante en la transmisión y diseminación de la enfermedad en los rebaños ovinos (Estein, 1999).

Entre los machos el contagio se produce comúnmente por convivencia, lamido de genitales o por montas entre ellos (Estein, 1999). Esta última conducta se observa entre machos sin experiencia sexual o en carnerillos jóvenes que, en acto de sumisión, se dejan montar por los machos dominantes del rebaño (OIE, 2008a). También la transmisión puede ocurrir a través de una hembra cuando un carnero, deposita semen infectado y luego otro macho la monta (Robles, 2008).

El carnero infectado con *B. ovis* constituye el principal reservorio en el rebaño, siendo el semen contaminado fundamental en la trasmisión de la enfermedad. La liberación de *B. ovis* en semen es intermitente y por períodos prolongados, habiéndose hallado cultivos positivos hasta 80 semanas post-infección experimental (Estein, 1999).

Las hembras, presentan una resistencia relativa al contagio, y sólo algunas de ellas desarrollan una infección activa después de la monta. Sin embargo, *B. ovis* persiste poco tiempo en la oveja y suele eliminarse antes de la siguiente parición; es por ello que el semen sería la principal y quizás la única fuente de infección (Blasco, 1990; Robles, 2008).

El examen clínico no es suficiente para el diagnóstico de la enfermedad, ya que solo el 50% de los animales infectados con *B. ovis* desarrollan alteraciones testiculares detectables a la

palpación (Blasco, 1990). Además existen otros microorganismos que causan epididimitis en los carneros, como por ejemplo *Actinobacillus lignieresii*, *Trueperella (Arcanobacterium) pyogenes*, *Chlamydiapsittaci*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Escherichiacoli*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, y *Pseudotuberculosis Yesinia*. Sin embargo, *Actinobacillus seminis*, *Histophilus somni* y *B. ovis* son los agentes causales más comunes (Estein, 1999; Moustacas *et al.*, 2013).

El diagnóstico bacteriológico, a partir del cultivo de muestras de semen, es bastante preciso, sin embargo tiene como inconveniente que el semen puede estar contaminado con otras bacterias que inhiben el desarrollo de *B. ovis*. Además el cultivo que necesita un medio selectivo a una atmósfera de 5 a 10% de CO₂, debiendo ser observado durante 10 días antes de dar un cultivo como negativo (Estein, 1999).

Existen varios métodos para el diagnóstico serológico que detectan anticuerpos (Ac) frente a *B. ovis*, entre los cuales están la Fijación del Complemento (FC), la Inmunodifusión en Gel de Agar (IDGA) y el Enzimoimmunoensayo (ELISA). La FC es la única prueba recomendada por la Organismo Mundial de Sanidad Animal (OIE) y la Unión Europea para el comercio internacional (OIE, 2008a). La sensibilidad de IDGA, FC y ELISA son similares, pero los mejores resultados se han obtenido por la combinación de IGDA y ELISA (Estein, 1999; Ridler *et al.*, 2006)

La técnica de ELISA, se caracteriza por ser más rápida, de fácil ejecución, con menor costo y permite un análisis masivo de animales (Estein, 1999). Por otro parte, cabe destacar, que la FC presenta desventajas como la ocurrencia de anti-complementariedad y no ser funcional con muestras de suero con presencia de hemolisis (Estein, 1999; López, 2007).

Nielsen *et al.* (2004), demostraron que el LPS-R de *B. abortus* RB51 puede ser utilizado como antígeno para la detección de anticuerpos de *B. ovis*, *B. canis* y *B. abortus* RB51 utilizando la técnica de la ELISA indirecto.

El control de esta enfermedad se basa en la eliminación de los animales seropositivos y/o con epididimitis clínica, evitando la introducción de carneros infectados (Estein, 1999). Para esta razón es importante contar con pruebas de diagnóstico validadas que presenten una alta eficiencia, altos niveles de sensibilidad y especificidad y que refleje además las

condiciones epidemiológicas de la población sobre la cual está siendo aplicada (Uzal *et al.*, 1995).

De acuerdo con el OIE (2008b), la creación y validación de una prueba de diagnóstico constituye un proceso acumulativo, que considera dos etapas: La primera consiste en establecer los parámetros y características del ensayo. Para esto es preciso determinar la factibilidad del método, diseñar el método de prueba, seleccionando, optimizando y estandarizando los reactivos y protocolos, y determinar los parámetros de rendimiento del ensayo. La segunda etapa, consistente en garantizar la validez continua de los resultados de la prueba y mejorar los criterios para su validación. Requiere un seguimiento constante del rendimiento del ensayo para comprobar su condición de ensayo validado y durante el uso cotidiano de éste y realizar las mejoras continuas que permitan mantener los criterios de validación.

Debido a la importancia de llegar a un diagnóstico certero de la enfermedad, en el presente trabajo se busca cumplir con la primera parte del proceso de validación el cual que implica desarrollar y validar un método ELISA indirecto usando antígenos de LPS-R de *B. abortus* RB51, para la detección de la infección por *B. ovis* en ovinos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del antígeno de *B. abortus* RB51

I. Cultivo de *B. abortus* RB51

*B. abortus*RB51 se obtuvo del cepario del Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Esta cepa fue cultivada en dos matraces de dos litros con 500 mL de caldo tripticasa soya estéril cada uno a una temperatura de 37°C durante 48 horas con agitación mecánica constante.

Finalizada la incubación, el cultivo se distribuyó en frascos de centrifuga de 200 mL cada uno. Estos fueron centrifugados a 2000 g a 4°C por 30 minutos (Meza, 2011), con el fin de eliminar el medio de cultivo y los residuos bacterianos resuspendidos en agua destilada estéril y centrifugados nuevamente. Este proceso se repitió tres veces con el fin de eliminar el medio de cultivo y lavar completamente las bacterias.

Al paquete de bacterias se le adicionó 2,5 mL de acetona por gramo de cultivo húmedo, con el fin de deshidratarlas. La suspensión de bacterias en acetona fue almacenada en estufa a 37°C hasta llegar a peso constante, debido a la evaporación del solvente.

II. Obtención del antígeno.

Para la extracción del LPS-R a partir de células de *B. abortus* RB51 previamente cultivadas, se utilizó el método de Galanos *et al.*, (1969), con una modificación sugerida por el Dr. Klaus Nielsen (Agriculture and Agri-Food, Canada)¹ que corresponde a una sonicación entre cada etapa de la extracción. Brevemente, las bacterias deshidratadas son sometidas a un método de extracción química con una mezcla de éter de petróleo, cloroformo y fenol en una proporción de 8:5:3. La mezcla se dividió en tres partes iguales de 160 mL. Un tercio se mezcló con tres gramos de células deshidratadas en un matraz redondo de un litro y se homogeneizó en un sonicador (Elma LC 60H®) por cinco minutos para dispersar las bacterias deshidratadas a una temperatura de 20° ± 2 °C.

¹Comunicación personal Dr. Klaus Nielsen.

La suspensión se centrifugó a 2000 g por una hora, a 4°C. Se recuperó y reservó el sobrenadante. El residuo bacteriano se mezcló con el segundo tercio de 160mL de la mezcla de extracción y se volvió a someter al mismo proceso y el sobrenadante recuperado se unió al primero obtenido. Este mismo proceso se realizó por una tercera y última vez.

Se sometió a evaporación en una estufa a 37°C durante 6 a 7 días con el fin de eliminar el éter y cloroformo dejando el fenol residual se agregó agua destilada para precipitar el LPS-R y para eliminar el fenol, se realizó una diálisis con la suspensión de LPS-R-Fenol, utilizando agua destilada. El proceso de diálisis se mantuvo por 72 horas a 4 °C. El precipitado de LPS-R fue centrifugado a 6000 g durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente fue liofilizado en el Laboratorio de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile y se determinó, la presencia de LPS-R por el contenido de KDO (Warren 1959; Osborn, 1963).

El antígeno LPS-R liofilizado de *B. abortus* RB51 fue reconstituido en agua destilada a una concentración de 1 mg/mL y se almacenó a $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$

Desarrollo de la prueba ELISA

En este estudio se trabajó con un total de 393 sueros de ovinos, 55 provenían de Punta Arenas y corresponden a ovinos con signos clínicos considerados infectados/expuestos a *B. ovis*, positivos a un *kit* de ELISA comercial detector de anticuerpos y a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en las muestras de semen, los análisis fueron realizados en el Laboratorio Regional del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG, Región de Magallanes y Antártica Chilena, Chile). 338 sueros pertenecen a ovinos negativos/no expuestos a *B. ovis*, sin signos clínicos provenientes de un rebaño libre de la infección y negativos a la prueba de FC. El rebaño ovino provenía del Centro Experimental Hidango (INIA-Rayentué, Región del Libertador Bernardo O'Higgins, Chile).

Se constituyó como control positivo (+) un *pool* de 10 sueros positivos (provenientes de los sueros de Punta Arenas y controles (+) de *kits* diagnósticos) y como control negativo (-), un *pool* de 10 sueros negativos (proveniente del rebaño de Hidango y de controles (-) de *kits* diagnósticos).

Establecimiento fase sólida

Para la adhesión del antígeno a la placa de poliestireno se siguieron las recomendaciones de varios autores (Abalos *et al.*, 1993; Nielsen *et al.*, 1996).

Se probaron dos tipos de placas de poliestireno, NUNC 69620 y NUNC Maxisorp, con dos tampones de sensibilización de distinto pH para la dilución del antígeno. Solución salina fosfato (PBS) pH 7,4 y el tampón Carbonato-Bicarbonato pH 9,6. Al mismo tiempo se probó en las placas dos tipos de conjugado: el conjugado policlonal anti IgG-ovina (Sigma A3415) y el conjugado monoclonal anti IgG-caprino/ovino (Sigma A9452), ambos con peroxidasa.

Las diluciones de trabajo del conjugado, la concentración óptima del antígeno LPS-R y la dilución de los sueros, fueron determinadas previamente mediante titulación del tipo “checkerboard”. Se seleccionó la alternativa que presentó un valor de razón de absorción (RA) mayor a 4 y que optimizó el uso de los reactivos tal como lo recomienda Crowther (2001). El esquema final de diluciones de conjugado, suero y antígeno se observa en el cuadro 1.

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

Cuadro 1

Esquema final de diluciones de conjugado, sueros y antígeno

	Antígeno 1/50				Antígeno 1/50				
	Suero 1/50		suero 1/100		Suero 1/50		Suero 1/100		
	1	2	5	6	7	8	11	12	
Monoclonal 1/5000 A	1,198	1,043	0,693	1,081	1,085	1,074	0,998	1,035	Monoclonal 1/3000
Monoclonal 1/10000 B	0,997	1,163	0,591	0,708	0,820	0,795	0,802	0,760	Policlonal 1/6000
Monoclonal 1/15000 C	0,800	0,979	0,445	0,594	0,732	0,746	0,681	0,689	Policlonal 1/9000
Cc	0,198	0,121	0,051	0,099	0,215	0,243	0,231	0,210	CC
Cc	0,053	0,057	0,067	0,041	0,038	0,037	0,042	0,043	Cc
Cc	0,089	0,045	0,069	0,069	0,044	0,051	0,042	0,044	Cc

Prueba ELISA-I

La alternativa de elección fue el uso de placas NUNC 6960. En la sensibilización el antígeno se utilizó en concentración de 1:50, diluido en tampón carbonato-bicarbonato 0,05M, pH 9,6 +/-0.05, incubadas a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18-24 horas. Estas se almacenaron a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$. Las placas fueron lavadas tres veces con solución de lavado, PBS con 0,05% de Tween-20, pH 7,2 (PBS-T). Los sueros se agregaron en duplicado en una dilución de 1:50 en PBS-T/EDTA 10 mM con una incubación a 37°C por una hora en agitación constante. Luego de tres lavados con PBS/T se adicionó 100uL del conjugado monoclonal Anti IgG caprina/ovina a cada pocillo en una dilución de 1:10000 en PBS/T, luego se llevó nuevamente a incubación a 37°C por una hora. Después de los tres lavados, se agregó el sistema sustrato-cromógeno compuesto por 1mM de ABTS (2,2'-azino bis (3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid)) y 4,4 mM de H_2O_2 en tampón citrato de sodio/ácido cítrico 0,05M, pH 4,5 +/- 0,05. Las placas fueron incubadas por quince minutos en agitación constante. Para la detección de la reacción enzimática se añadió una solución de Dodecil sulfato de Sodio (SDS) al 4%. La lectura de las absorbancias se realizó en un equipo INMUNSKAN Plus (BDSL) con un filtro de 405 nm que entrega los resultados en densidades ópticas (DO).

Para la interpretación de las lecturas, las DO fueron transformadas en porcentajes de positividad (PP). El control positivo de cada placa se consideró con un 100% de PP (FAO/IAEA, 1993)

$$PP = (OD \text{ suero problema} / OD \text{ control (+)}) \times 100$$

El “cut off” fue calculado utilizando el método de “Receiver-Operator Characteristic” (ROC) (OIE, 2008b), mediante el programa MedCalc. En esta operación fueron utilizados los PP de los 55 sueros positivos y los 338 sueros negativos, para establecer el mejor nivel de sensibilidad y especificidad.

RESULTADOS

En el establecimiento de la fase sólida, se seleccionó la placa NUNC 69620 que mostró mejores niveles de adsorción y fijación del antígeno. La dilución óptima del antígeno fue de 1:50; la misma dilución se seleccionó para los sueros. Se determinó el uso del conjugado monoclonal Anti IgG caprino/ovino con peroxidasa a una concentración 1:10.000, la cual entregó una RA de 7,5.

Validación de la prueba ELISA

El promedio de los PP en los sueros de los ovinos no infectados e infectados, obtenidos mediante ELISA con LPS-R de *B. abortus* fue de 15 % y un 81,6% respectivamente.

La línea de corte entregada por el programa MedCalc a través de la metodología ROC fue del 39,5% vale decir, que cuando el PP de los sueros sea igual o mayor a un 39,5%, estos serán calificados como positivos a la prueba ELISA y si el promedio de PP es inferior a 39,5%, calificarán como negativos a ella (grafico 1). El área bajo la curva fue de 0,960 con un intervalo de confianza de 0,936 a 0,977 y un error estándar de 0,021.1) Este “cut-off” establece una sensibilidad de un 92,7% y una especificidad de 98,5%. La representación de la curva de ROC se muestra en el Gráfico 2.

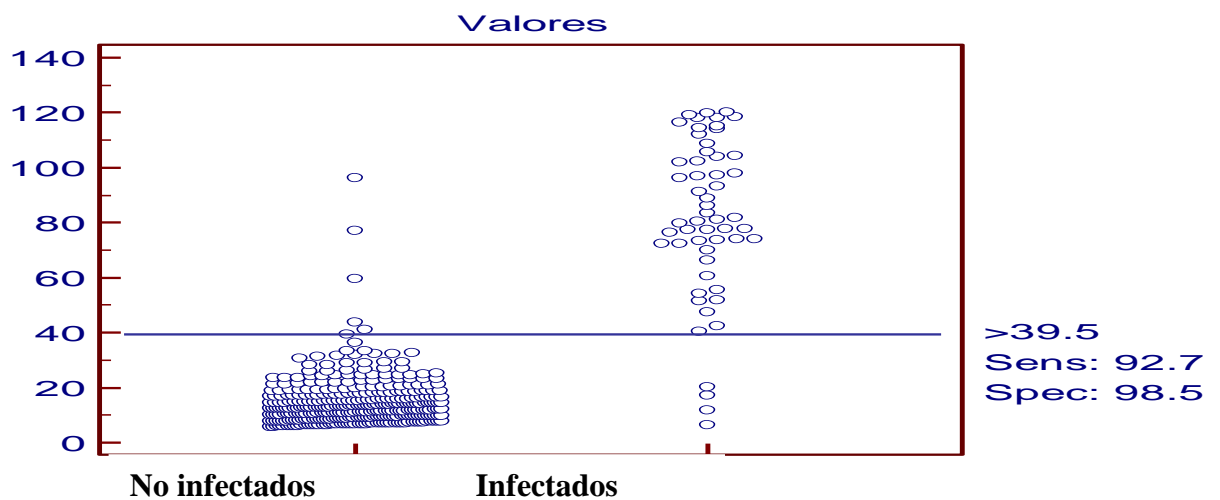


Gráfico 1: Diagrama de puntos de los Porcentajes de Positividad para los sueros de ovinos infectados/expuestos y no infectado/no expuestos a *Brucella ovis*.

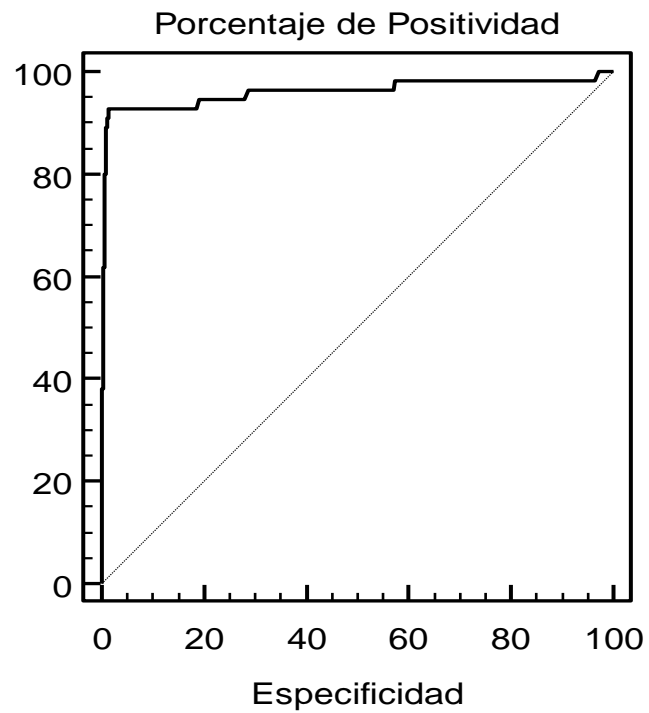


Gráfico 2: Representación del Análisis ROC de los Porcentajes de Positividad al ELISA indirecto utilizando LPS-R de *B. abortus* Cepa RB51 como antígeno.

DISCUSIÓN

El diagnóstico de la epididimitis ovina basado en el examen clínico es muy inespecífico. Por lo tanto, el diagnóstico por aislamiento bacteriano es un proceso complejo para la detección en gran número de animales en la época del pre-encaste, ya que requiere medios de cultivos enriquecidos, y una incubación prolongada en una atmósfera de CO₂ al 10% (Estein, 1999). Por las razones anteriores que las pruebas serológicas son las ideales para diagnóstico de esta enfermedad. Allí es donde la prueba de ELISA, método usado para detectar anticuerpos contra *B. ovis*, ha mostrado buenos resultados en sensibilidad y especificidad (López *et al.*, 2005).

El uso del LPS-R de *B. abortus* RB51 como antígeno, preparado de acuerdo al método de Galanos *et al.*, (1969) con modificación, permitió el reconocimiento de anticuerpos ovinos contra esta estructura antigénica, corroborando los datos obtenidos en diversos estudios (Nielsen *et al.*, 2004; Marambio, 2009). Esto se explica porque *B. ovis* es una cepa rugosa la cual comparte epítomos en el LPS-R con otras cepas rugosas de *Brucella* (Estein, 1999; Nielsen *et al.*, 2004)

En el desarrollo del ELISA se probaron los conjugados policlonal anti IgG-ovina y monoclonal anti IgG caprino/ovino, observándose valores de DO de 0.338 y 0.095 en los sueros negativos con el uso de cada conjugado respectivamente. Lo anterior se explica por el hecho de que el conjugado policlonal puede reaccionar con otro tipo de isotipos de anticuerpos, los cuales no son necesariamente producidos por una infección por *B. ovis* (Marín *et al.*, 1998; Gall *et al.*, 2003). Tanto el uso de conjugados monoclonales y de proteína G han permitido reducir las reacciones inespecíficas (Gall *et al.*, 2003).

El método de ELISA que se llevó a cabo, tuvo una baja absorbancia en los sueros negativos al utilizar la combinación de un antígeno LPS-R purificado, un conjugado monoclonal y el tipo de placa de poliestireno NUNC 69629. Se han observado ensayos donde los altos valores de reactividad inespecífica son dependientes de las microplacas de poliestireno (Nielsen, 1996).

El “cut-off” seleccionado mediante el método ROC, fue de un 39,5%. Este valor es la mejor combinación de sensibilidad y especificidad con valores de 92,72% y 98,52% respectivamente, logrando un bajo porcentaje de falsos negativos y falsos positivos. Estos resultados se observan en el gráfico 1, donde se aprecia una zona de solapamiento entre los sueros negativos y positivos. Los sueros de animales infectados que resultaron negativos al ELISA, puede deberse a que la signología de epididimitis fuera producto de otro agente y que la infección con *B. ovis* haya sido muy reciente, por ende, todavía no se han generado anticuerpos suficientes.

Los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos en este estudio, fueron mejores a la validación que realizó Álvarez *et al* en el año 2007, con un ELISA comercial para el diagnóstico *B. ovis*, el cual presentó valores de 82,9% y 91,4%, para sensibilidad y especificidad, y con resultados similares a los que se obtuvieron en otras pruebas desarrolladas (Gall, 2003; Nielsen *et al.*, 2004; Praud *et al.*, 2012).

Es importante destacar que el valor del “cut off” se puede ajustar de acuerdo al contexto epidemiológico que exista en la zona de estudio. Por ejemplo, si el ensayo se utiliza para determinar la infección por *B.ovis* en Punta Arenas, con el objetivo de controlar la enfermedad, la prueba debe otorgar la menor cantidad de falsos negativos, por lo tanto, el ELISA debe tener una alta sensibilidad. Distinto es el caso si la prueba se usa en zonas donde la enfermedad no está presente, en este caso debe otorgar la menor cantidad de falsos positivos a través de una alta especificidad en la prueba (Praud *et al.*, 2012).

Por otra parte, el método ELISA como prueba serológico, presenta una serie de ventajas sobre IDGA y FC. Ya que no se necesita inactivar los sueros y hay menores problemas con sueros hemolizados o anticomplementarios. Debido a que este método es una prueba de unión primaria que no se basa en fenómenos secundarios como la precipitación (IDGA) o la fijación del complemento. Consecuentemente, ELISA requiere una mínima cantidad de antígeno, es sencillo de realizar, con la ventaja de tener los resultados en unas horas, provee resultados fácilmente cuantificables, aplicables a un gran número de muestras, además de ser de fácil desarrollo y estandarización de los reactivos y los protocolos (Nielsen *et al.*,

2004; de Oliveira *et al.*, 2011). Por estas características el SAG, seleccionó al ELISA como prueba de tamizaje junto a FC como prueba confirmatoria para el Programa Voluntario de Certificación para Predios o Planteles Libres de Brucelosis Ovina.

En conclusión, se demostró que el uso del antígeno LPS-R de *B. abortus* RB51 en el desarrollo de un método de ELISA indirecto y su posterior validación, es útil para diagnóstico serológico de *B. ovis*, debido a los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos. Es importante destacar que la validación de una prueba diagnóstica es un proceso continuo, la cual requiere de constantes pruebas al protocolo estandarizado, de forma tal de asegurar que los resultados sean repetibles en el tiempo.

BIBLIOGRAFÍA

- ABALOS 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
- AFZAL M.; TENDERDY R., SQUIRE P., ELLIS R.** 1984. Characterization of *Brucella ovis* lipopolysaccharide and its use for the diagnosis of ram epididymitis by enzyme-linked immunoabsorbent assay. J. Clin. Microbiol. 20: 1159-1164.
- ALVAREZ J., VENEROS R., GONZÁLEZ O.** 2007. Validación operacional de un ELISA comercial para *Brucella ovis*, Chile. Arch. Med. Vet. 39:275-279.
- ARÉVALO 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. 31p.
- 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
- CROWTHER J.R.** 2001. The ELISA Guidebook. Humana Press Inc. 999 Riverview Drive, Suite 208. Totowa, New Jersey USA. 421 p.
- DE OLIVEIRA M.Z.D., VALE V., KEID L., FREIRE S.M., MEYER R., PORTELA R.W., BARROUIN-MELO S.M.** 2011. Validation of an ELISA method for the serological diagnosis of canine brucellosis due to *Brucella canis*. Res.Vet. Sci. 90, 425-431.
- 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
- FAO/IAEA.** 1993. Brucellosis ELISA kit manual *In:* Joint FAO/IAEA Division. Agriculture Laboratory. Animal Production and health unit. Seibersdorf, Austria. 35p
- GALANOS C., LUDERITZ O., WESTPHAL O.** 1969. A new method for the extraction of R lipopolysaccharide. Eur. J. Biochem.9: 245-249.

- 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 Ruminant Res*48, 173-179.
- LÓPEZ G., AYALA S.M., ESCOBAR G.I., LUCERO N.E.,** 2005. Use of *Brucella canis* antigen for detection of ovine serum antibodies against *Brucella ovis*. *Vet Microbiol.*105, 181-187.
- LÓPEZ G.** 2007. Estudio de Brucelosis causada por *Brucella ovis* en ovinos y personal en riesgo. Tesis Doctoral en Ciencias. Valencia, España. U Politécnica de Valencia. Dpto. Ciencia Animal. 137p.
- MARAMBIO C.** 2009. 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, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. U Chile.
- 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.* 390-394.
- MEZA M.**2011. Desarrollo de un ELISA indirecto con antígeno LPS-R de *Brucella abortus* Cepa RB51, para el diagnóstico serológico de brucelosis canina. Memoria de Título de Médico Veterinario Santiago, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. U Chile 19p
- MOUSTACAS V., SILVA T., COSTA L., XAVIER M., CARVALHO JUNIOR C., COSTA E., PAIXAO T., SANTOS R.** 2013. Species-specific multiplex PCR for the diagnosis of *brucella ovis*, *actinobacillus seminis*, and *histophilus somni* infection in rams. . *BMC Vet. Res* 9:51
- NIELSEN K., GALL D., KELLY W., VIGLIOCCO A.,HENNING D., GARCIA M.** 1996. Indirect Immunoassays. *In: Immunoassays Development: Application to*

enzyme Immunoassays for the diagnosis of Brucellosis. Agriculture and Agri-Food. Ontario, Canada.

- NIELSEN K., SMITH P., CONDE S., DRAGUI DE BENITEZ G., GAL, D.; HALBERT G., et al.** 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 Immunochem. 25:171-82

- OIE. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL.** 2008a. World Organization for Animal Health. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres. 4^o edición. Capítulo 2.7.9: Epididimitis ovina [en línea] <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-terrestre/acceso-en-linea/> [consulta: 13-11-2012]

- OIE. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL.** 2008b. World Organization for Animal Health. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres. 4^o 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 [consulta: 13-11-2012]

- OSBORN M.J.** 1963. Studies on the Gram-negative cell wall, I. Evidence for the role of 2-keto-3-deoxyoctonate in the lipopolysaccharide of *Salmonella typhimurium*. Proc. Natl. Academy of Sci. USA. 50: 499-506.

- PAPPAS G.** 2010. The changing *Brucella* ecology: novel reservoirs, new threats. Int J Antimicrob Agents. 2010; 36S:S8-11

- PRAUD A., CHAMPION J., CORDE Y., DRAPEAU A., MEYER L., GARIN-BASTUJIB.** 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., WEST D., STAFFORD K., WILSON P.** 2006. Persistence, serodiagnosis and effects on semen characteristics of artificial *Brucella ovis* infection in red deer stags. NZVJ.54(2), 85-90, 2006
- ROBLES C.** 2008. Brucelosis en carneros por *Brucella ovis*. 1° Ed. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - INTA, EEA Bariloche, Argentina. 27p
- TSOLIS RM., SESHADRI RL., SANTOS R., SANGARI., LOBO J., DE JONG M., QINGHU R., MYERS G., BRINKAC M ., NELSON ., NELSON ., DEBOY R., ANGIUOLI S., KHOURI H., DIMITROV G., ROBINSON J., MULLIGAN., WALKER R., ELZER P., HASSAN K., PAULSEN.** 2009. Genome degradation in *Brucella ovis* corresponds with narrowing of its host range and tissue tropism. PLoS ONE 4(5): e5519
- SELEEM M., BOYLE M., SRIRAGANATHAN N.**2010. Brucellosis: a re-emerging zoonosis. Vet. Microbiol. 140:392-8
- UZAL F., ABALOS P., PADILLA POESTER F., ROJASX., DAJER A., SILVA M., NIELSEN K., WRIGHT P.** 1995. Evaluation of an indirect ELISA kit for the diagnosis of bovine brucellosis in Latin American. Arch. Med. Vet 27: 59-63.
- WARREN L.** 1959. The Thiobarbituric Acid Assay of Sialic Acids. J.Biol Chem. 234 (8): 1971 - 1975

