



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



**“SEROREACTIVIDAD POR INMUNODIFUSIÓN EN CARNEROS
INOCULADOS CON *BRUCELLA OVIS* CEPAS ESTÁNDAR Y
SILVESTRE, FRENTE A LOS ANTÍGENOS HOMÓLOGO Y
HETERÓLOGO”.**

MARIE ISABEL WAINWRIGHT FLISFISCH

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

PROFESOR GUIA: Dra. María Luisa Sánchez. Chong

SANTIAGO, CHILE

2007



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



“SEROREACTIVIDAD POR INMUNODIFUSIÓN EN CARNEROS INOCULADOS CON *BRUCELLA OVIS* CEPAS ESTÁNDAR Y SILVESTRE, FRENTE A LOS ANTÍGENOS HOMÓLOGO Y HETERÓLOGO”.

MARIE ISABEL WAINWRIGHT FLISFISCH

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

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA: María Luisa Sánchez C
PROFESOR CONSEJERO: Pedro Ábalos.
PROFESOR CONSEJERO: Claudio Zúñiga.

SANTIAGO, CHILE

2007

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
SUMMARY	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 EPIDEMIOLOGÍA.....	8
2.2 PATOGENIA	11
2.3 CONTROL	12
2.4 DIAGNÓSTICO.....	14
3. HIPÓTESIS	17
4. OBJETIVO GENERAL	17
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
6. MATERIAL Y MÉTODOS	18
6.1 MATERIAL	18
6.1.1 Cepas	18
6.1.2 Antígenos.....	18
6.1.3 Sueros de ovinos inoculados experimentalmente.....	18
6.1.4 Suero control positivo.....	19
6.2 MÉTODOS.....	19
6.2.1 Preparación de Antígenos.....	19
6.2.1 Obtención de sueros	19
6.2.3 Prueba de Inmunodifusión doble en gel de agar.....	20
6.2.4 Análisis Estadístico:	21
7. RESULTADOS	22
8. DISCUSIÓN.....	29
9. CONCLUSIONES.....	35
10. BIBLIOGRAFÍA	36

RESUMEN

Brucella ovis (*B. ovis*) es el agente etiológico de la “epididimitis del carnero”, enfermedad de distribución mundial que provoca pérdidas económicas importantes en la producción ovina, debido a una baja en la fertilidad por la epididimitis y orquitis que induce en los carneros y a esporádicos abortos en ovejas.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar en el tiempo, mediante la prueba de inmunodifusión doble en gel de agar (ID), dos antígenos obtenidos por extracción salina caliente de *B. ovis* elaborados de dos cepas diferentes, uno de la cepa estándar 63/290 y el otro de la cepa chilena Til Til. Ambos antígenos fueron enfrentados a los sueros de dos carneros, cada uno inoculado experimentalmente con una de las cepas, además estos dos antígenos fueron reaccionantes positivos con el suero control positivo. Se comparó la reactividad de cada antígeno frente a los sueros tanto homólogos como heterólogos. Se utilizaron 54 sueros de cada carnero infectado, obtenidos sistemáticamente durante un periodo de 420 días de observación.

Los sueros del carnero inoculado con la cepa Til Til, enfrentados a su antígeno heterólogo Ag. 63/290, presentaron un mayor porcentaje de positividad (65%) que con el Ag. homólogo TilTil (25%). La positividad detectada por el Ag 63/290 se mantuvo por un periodo continuo de 23 semanas mientras que con el Ag TilTil fue de solo 9 semanas y con un alto número de sueros sospechosos. La positividad de los sueros del carnero inoculado con cepa Til Til no se mantuvo hasta el final de la experiencia.

Los sueros del carnero inoculado con la cepa 63/290 no presentaron reactividad con ninguno de los dos antígenos.

El análisis del contenido proteico de cada antígeno fue de 1,4 y 1,1 mg/ml para Ag Til Til y 63/290 respectivamente.

Palabras claves: *Brucella ovis*, *epididimitis carnero*, *inmunodifusión*, *antígeno homólogo*, *antígeno heterólogo*.

SUMMARY

Brucella ovis is the etiological agent of “rams epididymitis”, a disease of worldwide distribution, that causes economical losses on ovine livestock, due to a fall on fertility by the epididymitis and orchitis produced on rams and due to the sporadic abortions on ewes.

The aim of this research was to evaluate sera collected across several weeks, through the agar gel immunodiffusion (AGID) test, two different antigens of *B. ovis* obtained by the hot saline method (HS), prepared from two different strains, one of the standar strain 63/290 and the other from the chilean strain Til Til. Both antigens were faced to two ram sera each of them exprimentally inoculated with one of the strains. The reactivity of each antigen was compared with both homologous and heterologous sera.

Fifty four sera of each infected ram were used. These sera were systematically obtained during an observation period of 420 days.

The sera of the inoculated ram with the Til Til strain, faced to his heterologous Ag.63/290, showed a greater percentage of positiveness (65%) than with the homologous Ag. Til Til (25%). The positiveness detected by the Ag. 63/290 remained through a continual period of 23 weeks; while with Ag.Til Til it was only for 9 weeks and with a high number of suspicious sera.

The sera of the ram inoculated with strain 63/290 did not show reactivity with none of the antigens.

The positiveness of sera of the ram inoculated with strain Til Til did not remain until the end of the experiment.

The analysis of the proteinic content of each antigen was 1,4 and 1,1 mg/ml for Ag Til Til and 63/290 respectively.

Key words: Brucella ovis, ram epididymitis, immunodiffusion, homologous antigen, heterologous antigen.

1. INTRODUCCIÓN

En Chile los sistemas de producción utilizados en rebaños ovinos son en su mayoría extensivos, caracterizándose por depender casi en forma exclusiva del recurso de praderas naturales existentes. El uso de concentrados y forrajes conservados es poco frecuente, todo lo cual está muy relacionado con la alta capacidad de adaptación a diversas condiciones ambientales que poseen estos animales.

La masa ovina nacional, que alcanza a 3.695.062 cabezas (INE, 2000), se concentra principalmente en la XI y XII regiones, donde se encuentra el 61% del total nacional, con un claro predominio de la raza Corriedale; el resto de la masa ovina se encuentra entre la IV y X regiones, siendo en su mayoría rebaños medianos a pequeños constituidos principalmente por las razas Merino Precoz, Suffolk Down, Hampshire Down y Romney Marsh (García, 1998).

Un 76.6% del total nacional de los ovinos se encuentra en manos de pequeños y medianos productores los que, por lo general, poseen limitados recursos económicos, siendo, por lo tanto, esta actividad una importante fuente de trabajo y subsistencia. Por otro lado existe un grupo de grandes productores, en su mayoría de la Región de Magallanes, que han sido capaces de exportar lana y carne principalmente a Latinoamérica y mercados aun más exigentes como la Comunidad Europea.

Frente a este escenario nacional y para mejorar la productividad, especialmente de los sectores marginales, surge la necesidad básica de tener una sanidad animal adecuada que nos permita competir en mercados más exigentes; es por esto que el control y erradicación de ciertas patologías infecciosas hace necesario tener programas que incluyan métodos diagnósticos adecuados y eficaces.

Dentro de las enfermedades infectocontagiosas de distribución mundial y presentes en Chile, que provocan un detrimento importante en la producción ovina, se encuentra la “epididimitis del carnero” cuyo agente etiológico es la bacteria *Brucella ovis* (*B. ovis*). Esta patología se caracteriza por producir una menor fertilidad en machos debido a la

epididimitis y orquitis que provoca y en el caso de las hembras, inducir ocasionalmente abortos y mortalidad perinatal.

B. ovis infecta en forma exclusiva a los ovinos, situación que la diferencia de otras especies de **Brucella**, las cuales pueden afectar a varias especies productivas, además **B. ovis** no es zoonótica.

En los países productores de ovinos el control de la enfermedad se basa en la eliminación de los machos con diagnóstico bacteriológico y/o serológico positivo, junto a la vacunación en lugares de alta prevalencia, aunque sobre esto último no hay un consenso del mejor inmunógeno a aplicar.

En Chile el control se basa en el examen clínico de los machos previo a la temporada de encaste, eliminándose los que presentan alteraciones testiculares o epididimarias, además, se realizan pruebas serológicas de laboratorio como la inmunodifusión doble en gel de agar, fijación del complemento y la prueba de ELISA. Estas técnicas utilizan antígenos solubles obtenidos a partir de **B.ovis**. La Oficina Internacional de Epizootias (OIE) recomienda el uso de la cepa estándar REO 198 e idealmente, la incorporación de distintos biotipos según el país.

De las técnicas serológicas utilizadas a nivel nacional, ninguna ha sido validada hasta la fecha. La aplicación de vacunas, por otra parte, ha sido sólo experimental y no como medida de manejo general.

La connotación negativa de la enfermedad sobre parámetros reproductivos y productivos, motiva la búsqueda de los mejores métodos diagnósticos y por lo tanto, de los mejores antígenos que son la base para la eliminación de reproductores infectados, a pesar de no existir un programa oficial de control nacional.

Resulta interesante y necesario determinar en relación al diagnóstico, si es mejor utilizar un antígeno elaborado a partir de una cepa estándar cuyo biotipo no este necesariamente presente en el país o un antígeno elaborado a partir de una cepa presente en el territorio nacional.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Las bacterias del género *Brucella* son pequeños cocobacilos Gram negativos que no forman esporas ni cadenas y pueden permanecer viables sobre cuatro meses en orina, leche y suelos húmedos; pero, son sensibles a las temperaturas de pasteurización y a los desinfectantes comunes como cloro, fenol y formol (Meyer, 1990).

Son parásitos intracelulares facultativos, que presentan una mayor predilección por el tejido reproductivo y células del sistema monocito-macrófago. En la actualidad se han reconocido las especies *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Brucella ovis*, *Brucella canis*, *Brucella neotomae* (Carter *et al.*, 1995) y las más recientemente descritas *Brucella cetaceae* y *Brucella pinnipediae*, aisladas a partir de especies de mamíferos marinos (Cloekcart *et al.*, 2001).

Brucella ovis (*B. ovis*) es el agente etiológico de una enfermedad de transmisión sexual, clínica o subclínica, que afecta a los ovinos y es conocida como “Epididimitis del carnero”. Se caracteriza por producir lesiones en los genitales de los machos y disminuir su fertilidad; en las hembras, en menor frecuencia, produce un incremento de la mortalidad perinatal y abortos debido a la placentitis que ocasiona. La enfermedad se distribuye mundialmente provocando un impacto económico negativo, especialmente en aquellos países donde la producción ovina es una actividad importante. En estos países la explotación ovina se ve afectada por bajos índices reproductivos, abortos, fallecimiento de corderos prematuros, un alto número de carneros descartados anualmente con un acortamiento de su vida reproductiva; todo esto trae como consecuencia una disminución en la producción de carne y lana por hectárea (Estein, 1999).

El efecto de la enfermedad sobre la fertilidad del carnero puede influir en el número de machos necesarios en un rebaño, siendo el índice carnero por oveja significativamente menor en los rebaños libres de *B. ovis*. Se describe también que el porcentaje de corderos se puede reducir en un 30% en rebaños recién infectados, cifra que baja a 15-20% en rebaños donde la infección es endémica (Radostits *et al.*, 1999).

La patología ha sido reportada en numerosos países como Argentina, Australia, Brasil, Canadá, Chile, España, México, Nueva Zelanda, Perú, Rumania, Rusia, Uruguay, E.E.U.U, África y numerosos países de la Unión Europea. Su existencia se considera probable en la mayoría de los países productores de ovinos (OIE, 2004).

En Chile *B. ovis* fue aislada por primera vez en 1968 por Alegría *et al*, a partir de carneros de la zona central y en 1971 en la zona sur del país (Tamayo *et al.*, 1989). Posteriormente se ha diagnosticado en otras regiones, señalándose en estudios parciales y locales prevalencias entre 5 y 17% (Pinto D'Aguiar *et al.*, 1986). Un estudio realizado por la Universidad Austral el año 1990 a pequeños predios de la X Región reveló que de 719 sueros ovinos analizados hubo un porcentaje de positividad que fluctuó entre 8,3 y 2,8% para las pruebas de ELISA e ID respectivamente (Rojas *et al.*, 1990). En otro estudio, de Sánchez *et al* (2006), se comunicó una prevalencia de 26,36% en un total de 2212 muestras de ovinos, principalmente carneros de Magallanes, que se recibieron entre 1995 y 2002 en el Servicio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Actualmente, en relación con la situación sanitaria de Chile, en el año 2004 el Servicio Agrícola Ganadero ha informado la presencia de la enfermedad, limitada a ciertas regiones no especificadas (SAG, 2004).

B. ovis, al igual que *B. canis*, originan naturalmente sólo colonias en fase rugosa (R), no presentando el fenómeno de disociación de colonias, diferenciándose así de las “brucelas clásicas” (*B. mellitensis*, *B. abortus*, *B. suis*) que forman colonias lisas (S) o rugosas. Las brucelas en fase rugosa carecen de polisacárido-O o cadena O en la estructura de su membrana celular externa; este polisacárido posee la mayor cantidad de epitopos antigénicos del lipopolisacárido liso (LPS-S) (Blasco, 1990).

En relación con la estructura antigénica de *B. ovis*, se sabe que presenta una envoltura celular trilaminar, compuesta por una membrana interna o citoplasmática, un espacio periplásmico rico en proteínas solubles y proteoglicanos y finalmente una membrana externa en la que se encuentran los dos grupos de antígenos mayores, el lipopolisacárido rugoso (LPS-R) y las proteínas de membrana externa; ambos presentan

epitopos accesibles para los anticuerpos (Bowden *et al.*, 1995). El LPS-R es una molécula compleja de bajo peso molecular, constituida por el lípido A y un núcleo o core compuesto 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). Aunque en el lípido A y en el core existen epitopos que son compartidos con otras brucelas, también hay epitopos específicos para *B. ovis* (Estein, 1999).

La membrana externa contiene dos grupos de proteínas que se clasificaron en los años ochenta en mayores y menores según su abundancia relativa, denominadas también como grupos 2 y 3. Las proteínas del grupo 2 poseían una masa molecular entre 36-38 KDa., mientras que las del grupo 3 se encontraban entre 31-34 y 25-27 KDa. Los genes que codifican a las proteínas del grupo 2 fueron identificados a fines de los años ochenta siendo llamados *OMP 2a* y *OMP 2b*. A principios de los años noventa se identificaron dos genes que codifican para las proteínas del grupo 3, se les denominó: *OMP 25* y *OMP31*. El uso de tecnología molecular avanzada ha permitido demostrar que las proteínas externas de membrana son poco relevantes en términos antigénicos para las brucelas lisas, mostrando una muy baja y casi nula protectividad en modelos murinos; sin embargo, en el caso de la *B. ovis* las proteínas externas de membrana específicamente las del grupo 3 han resultado ser antígenos inmunodominantes en el caso de las infecciones experimentales en carneros y ratones. Como *B. ovis* carece de cadena O, las proteínas de la superficie de la membrana externa quedan más expuestas y accesibles a los anticuerpos. Por este motivo el extracto salino-caliente (HS), que corresponde a un complejo molecular compuesto por LPS-R y proteínas externas de membrana, ha mostrado tener un rol protector frente a infecciones experimentales tanto en ovinos como en ratones (Cloekcart, 2002). Incluso se ha demostrado que al extraer el LPS-R del extracto salino-caliente éste último conservaría una actividad protectora (Jiménez de Bagües *et al.*, 1994).

El interés en estas proteínas de membrana radica, principalmente, en su potencial uso como antígenos ya sea para el desarrollo de nuevas vacunas o para mejorar el diagnóstico de la enfermedad.

Recientemente se han demostrado diferencias entre cepas de referencia de *B. ovis* como Reo198 y 63/290 y cepas de campo, diferenciándose a través de Reacción en cadena de la polimerasa y técnica de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP). Se describe además que los genes *Omp2* de porinas (proteínas del grupo 2), serían especialmente divergentes entre cepas de campo y cepas estándares. Todo esto indica que podrían existir diferencias antigénicas importantes entre cepas de *B. ovis*, lo que sin duda podría influir en un diagnóstico más acucioso de la enfermedad (Cloeckart *et al.*, 1996).

2.1 EPIDEMIOLOGÍA

Se ha descrito que *B. ovis* se transmite exclusivamente a la especie ovina en forma natural y no se ha reportado la infección en el hombre (Blasco, 1990; Estein, 1999).

La mayoría de los autores concuerda en que el macho juega un papel preponderante en la distribución de la brucelosis ovina, siendo más susceptible a la infección que la hembra; ésta no juega un rol epidemiológico importante al ser más resistente a la infección que el macho, a diferencia de lo ocurrido en otras brucelosis en que la hembra tiene un rol epidemiológico más importante (Pinochet *et al.*, 1981; Estein, 1999). Se ha descrito que el carnero al ser la principal fuente de infección, perpetúa la enfermedad dentro del rebaño; la mayoría de los carneros infectados eliminan la bacteria en el semen, en forma intermitente provocando el contagio de otros machos a través de la monta, la convivencia o los lamidos (Pinochet *et al.*, 1981; Radostits *et al.*, 1999).

Sin embargo, algunos investigadores describen que *B. ovis* causa una infección mamaria persistente en algunas hembras, prolongándose incluso por más de dos lactancias; éstas hembras podrían jugar un rol epidemiológico importante en la mantención de la enfermedad en el rebaño ya que usualmente los machos son los eliminados si se sigue un programa de control habitual (Grilló *et al.*, 1999). En estos casos la bacteria se localizaría en la placenta, secreciones vaginales y leche (Radostits *et al.*, 1999).

La transmisión natural de la enfermedad se produce a través de distintas formas:

- Infección sexual o venérea pasiva: esta ocurre a partir de ovejas cubiertas por

carneros infectados que, posteriormente, son montadas por otros carneros sanos que podrían, a su vez, contraer la infección.

- Infección entre carneros: esta ocurre en forma directa a través de la monta, ingresando la bacteria (que se encuentra presente en el semen) a través de la mucosa rectal. Sin embargo, muchas de las infecciones se transmitirían por la ruta oral, debido a lamidos en las zonas genitales como acto de sumisión de los carneros no dominantes (OIE, 2004).

La bacteria es capaz de sobrevivir en el ambiente durante varios meses; sin embargo, la transmisión a través de vectores pasivos o mecánicos no posee una importancia práctica. Los corderos nacidos de hembras infectadas y que consumen leche con la bacteria no se infectan de modo persistente (Radostits, *et al* 1999). Grilló *et al.* (1999) describen que en un estudio realizado con hembras preñadas, infectadas experimentalmente, solo el 60% de las hembras eliminó la bacteria en la leche durante la lactancia y que todos los corderos hijos de esas hembras, sometidos a pruebas serológicas entre los 13 a 15 meses de edad resultaron negativos.

Muchos autores sugieren que existe cierta resistencia de la raza Merino a la enfermedad, siendo las razas Inglesas las más susceptibles (Blasco, 1990). La infección ha sido demostrada en carneros de cuatro meses de edad, sugiriendo que los animales púberes son susceptibles a *B. ovis*, sin embargo como la ruta de infección más importante es la sexual los animales adultos tienen mayor tendencia a estar naturalmente infectados. Más aun se ha observado que la incidencia de lesiones testiculares y de brucelosis aumenta con la edad y con la experiencia sexual. En condiciones naturales la transmisión entre carneros se produce durante la época de encaste, aunque también puede ocurrir fuera de la época reproductiva cuando los carneros se encuentran agrupados debido a las conductas homosexuales y de sumisión (Blasco, 1990).

Cuando el número de carneros infectados en el rebaño es mayor al 10%, la fertilidad disminuye considerablemente afectándose los parámetros reproductivos (Radostist *et al.*, 1999).

Las hembras encastadas por machos infectados raramente desarrollan la enfermedad que las lleve a abortar o al nacimiento de corderos muertos o débiles. Algo muy similar a esto se describe al infectar experimentalmente hembras preñadas (Grilló *et al.*, 1999). Es muy infrecuente además que la infección en la hembra continúe a la siguiente parición o encaste (Radostits *et al.*, 1999).

En una experiencia con hembras infectadas experimentalmente, aquellas que lo fueron antes del encaste y al final de la gestación, no manifestaron abortos; sólo presentaron abortos las hembras que fueron infectadas durante la primera mitad de la gestación (Blasco, 1990).

Experimentalmente se puede lograr la infección de carneros por diversas rutas; oral, intravenosa, intra testicular, conjuntival, intra prepucial, subcutánea, intra nasal, intra rectal y a través de lesiones cutáneas. Aunque los mejores resultados se obtienen por las vías conjuntival y prepucial, se recomiendan dosis de 5×10^8 a 10^9 unidades formadoras de colonia (cfu) para alcanzar tasas cercanas al 100% de infección (Radostits *et al.*, 1999).

La OIE (2004) informa que tanto bovinos, como caprinos, y ciervos han demostrado ser susceptibles a la infección experimental; sin embargo, la infección natural sólo se habría reportado en ciervos además de en ovinos.

Ridler *et al.* describen, en el año 2000, que la infección en Nueva Zelanda se habría transmitido desde carneros positivos a ciervos rojos negativos y que éstos a su vez fueron capaces de contagiarse entre ellos a través del contacto directo. Posteriormente, el año 2001, Ridler demostró que la calidad del semen de los ciervos también se afectaba por *B. ovis*, encontrando un alto número de leucocitos, una baja motilidad espermática y alteraciones en la cabeza del espermio (Ridler, 2001).

El año 2005 Ridler *et al.* realizaron otro estudio en Nueva Zelanda, con diez aislamientos de ovinos y dos de ciervos rojos. Utilizando la técnica de electroforesis de campos pulsados (PFGE) y las enzimas de restricción XbaI y SmaI encontraron que diez de los aislados correspondían a la misma cepa porque compartían bandas idénticas, mientras

que los otros dos aislados difirieron en seis bandas, determinándose así que estas últimas correspondían a una cepa diferente de *B. ovis*; ambas cepas recién diferenciadas estaban presentes tanto en ovino como en ciervo determinándose, también, que no habría una cepa especie específica que afecte a los ciervos (Ridler *et al.*, 2005).

2.2 PATOGENIA

La bacteria ingresa al hospedero susceptible atravesando la mucosa, ya sea rectal, vaginal peneana u oral, llegando luego a los linfonodos regionales a través de aferentes linfáticos. Posteriormente algunos microorganismos pueden llegar a la sangre causando una bacteremia. En esta etapa el animal puede cursar con fiebre, apatía y aumento de la frecuencia respiratoria. Bajo condiciones experimentales se ha visto que la bacteria permanece confinada en los ganglios más cercanos al sitio de entrada por cerca de 2 a 3 semanas. Se ha podido aislar la bacteria de animales inoculados experimentalmente a partir de hígado, riñones, bazo, linfonodos submaxilares, preescapulares, precrales, retrofaringeos, glándulas sexuales accesorias y epidídimo. Sin embargo, las manifestaciones generales mencionadas no son características de la infección natural, ya que en ésta las manifestaciones clínicas son debido a la inflamación del epidídimo, vesículas seminales, y glándulas bulbo uretrales, órganos blanco del microorganismo (Kimberling, 1988).

La localización final de la bacteria en el epidídimo produce una serie de cambios a nivel de éste: edema perivascular, infiltración y acumulo de linfocitos, monocitos y neutrófilos en el tejido peritubular, acumulación de fluido en el intersticio, e hiperplasia de las células del ducto; finalmente debido a todo esto se produce una destrucción del epitelio con la consiguiente extravasación espermática hacia el intersticio, produciéndose una reacción inflamatoria e inmunitaria, más frecuentemente en la zona de la cola del epidídimo y de forma unilateral. Se forman granulomas y finalmente se puede llegar a una atrofia testicular debido a la completa oclusión del ducto epididimal que provoca finalmente la degeneración de los túbulos seminíferos (Kimberling, 1988; Blasco, 1990). La calidad del semen varía en número, motilidad y morfología de los espermatozoides; se describen anomalías en la cabeza y el acrosoma, además se encuentran leucocitos y brucelas.

Todo esto lleva a una disminución de la fecundidad, pudiendo incluso llegar a la completa esterilidad cuando se produce atrofia testicular (Orellana 1982).

En las ovejas el principal efecto de la infección es una placentitis que interfiere con la nutrición del feto y que puede causar su muerte; pero, más frecuente que el aborto es el hecho que los corderos lleguen a término pero con un bajo peso al nacimiento y escasa viabilidad (Kimberling, 1988; Radostits *et al.*, 1999; OIE, 2004). Los casos de aborto suelen ocurrir en el último tercio de la gestación, encontrándose que la superficie membranosa entre los placentomas contiene gruesas placas de exudado purulento de un color blanco-amarillento; este exudado contiene bacterias, macrófagos, neutrófilos y células epiteliales descamadas. Los cotiledones se desprenden fácilmente de las carúnculas pudiendo presentar distintos grados de necrosis y el corioalantoides, en los casos más severos, se encuentra más delgado, con edema del tejido intersticial y fibrosis. También son comunes las lesiones a nivel de los vasos de la placenta. No se reconocen lesiones patognomónicas para la infección por *B. ovis* (Blasco, 1990).

2.3 CONTROL

La manera más simple de disminuir la incidencia de la infección es eliminando a los machos que presentan alteraciones testiculares a la palpación; aunque este método disminuye los niveles de incidencia, no sirve para eliminar la enfermedad completamente del rebaño. Los métodos serológicos son los más adecuados para detectar a los animales infectados (Blasco, 1990; Radostits *et al.*, 1999).

El control se orienta a la identificación y eliminación de los animales seropositivos y/o con epididimitis clínica evitando, además, el ingreso de machos infectados. Por otro lado también es importante separar a los corderos vírgenes de los machos adultos potencialmente infectados (Kimberling, 1988).

En teoría se recomienda realizar las pruebas serológicas durante el periodo de baja actividad sexual, identificar así a los animales positivos y repetir este procedimiento a los 45

a 60 días después hasta que el rebaño se encuentre libre de la infección.

Idealmente se debería situar a los animales libres sanos en un ambiente limpio, repetir anualmente las pruebas serológicas y el examen clínico para monitorear el estado sanitario del rebaño (Kimberling, 1988).

La vacunación es el método más práctico y económico para controlar la enfermedad, especialmente en lugares con alta prevalencia ya que la erradicación por medio de pruebas serológicas y eliminación de animales positivos se vuelve impracticable especialmente en el caso de rebaños grandes (Blasco, 1990).

Existen numerosas vacunas en uso, pero ninguna de ellas es completamente eficaz (Radostits *et al*, 1999). La OIE describe la vacuna viva atenuada de *B. melitensis* cepa Rev. 1 como la más eficaz y adecuada, siendo necesaria una dosis (10ufc) por vía subcutánea o conjuntival entre los 3-5 meses de edad. Sin embargo, esta presenta ciertas desventajas, como no estar permitida en países libres de *Brucella melitensis* y además, ser una cepa patógena para el hombre. Por otro lado, la respuesta serológica a esta vacuna interfiere con el diagnóstico serológico de *B. melitensis*, bacteria que también afecta al ovino (Muñoz *et al.*, 2005).

Radostitis *et al.* (1999) informan que vacunas como *B. abortus* RB51 han demostrado no proteger totalmente a los carneros frente a la infección experimental con *B. ovis*. Los mismos autores señalan que el uso de vacunas de *B. ovis* inactivadas, incluso con adyuvantes, serían poco eficaces; sin embargo, esto se contrapone a lo informado por Pinochet *et al* (1987) quienes no obtuvieron aislamiento bacteriano de la cepa desafío en 12 carneros vacunados previamente con la bacterina de cepa rugosa de *B. abortus* 45/20-adyuvante oleoso, a diferencia del grupo no vacunado donde se aislaron en 6 de 13, logrando así un recurso de valor práctico en rebaños de alta prevalencia. La vacunación hizo reaccionantes positivos a la ID a todos los animales vacunados. Estudios más recientes señalan que el empleo de componentes estructurales de la pared celular de *B. ovis* son mejores antígenos para inducir una respuesta humoral deseable (Gamazo *et al.*, 1989; Riezu-Boj *et al.*, 1990).

Actualmente la búsqueda de nuevas opciones de vacunas para prevenir la enfermedad ha llevado a probar componentes de la membrana externa celular, obtenidos mediante extracción salina caliente, unidos a micropartículas de poly-ε-caprolactone (PEC); esta vacuna mostró conferir una protección similar a la de referencia Rev. 1. Las micropartículas encapsulan al complejo HS y a través de complejos procesos se logran obtener partículas suaves y esféricas de tamaño entre 1-3 micrones; partículas de mayor tamaño no serían tomadas por las células presentadoras de antígeno del sistema inmune (Murillo *et al.*, 2002; Muñoz *et al.*, 2005).

2.4 DIAGNÓSTICO

Existen diversos y numerosos métodos para el diagnóstico de la infección por *B. ovis*.

Examen Clínico: éste consiste en la palpación simultánea de ambos testículos y epidídimos encontrándose, en los animales afectados, las tunicas escrotales engrosadas y endurecidas, pudiendo incluso desaparecer el surco entre testículos y epidídimos. Sin embargo, muchos carneros infectados no presentan lesiones palpables o éstas pueden deberse a otros agentes como *Corynebacterium pseudotuberculosis (ovis)*, *Staphylococcus* y *Streptococcus* (Pinochet *et al.*, 1981) *Actinobacillus seminis*, *Histophilus spp*, *Haemophilus ovis*, *B. mellitensis* y *Chlamydia psitacci*. Solo el 50% de los animales infectados con *B. ovis* presenta epididimitis, no siendo por consiguiente este método lo suficientemente específico para el diagnóstico (OIE, 2004). Adicionalmente, los animales infectados que presentan alteraciones testiculares palpables pueden volver a la normalidad en pocas semanas, aunque un examen histológico muestra en estos casos lesiones en epidídimo y glándulas sexuales accesorias (Blasco, 1990).

Cabe mencionar, además, que un alto número de las lesiones epididimarias en carneros son debido a traumas (OIE, 2004).

La confirmación de la enfermedad en el laboratorio puede realizarse a través de métodos directos (aislamiento de *B. ovis* a partir de muestras de semen, tejidos, leche, o

descargas vaginales) o indirectos (pruebas serológicas). El cultivo y aislamiento bacteriano es descrito como el mejor método directo.

Cultivo de semen: obtenido por electroeyaculación, se realiza sobre medios especiales, además, el semen es examinado microscópicamente para determinar la existencia de anomalías en la motilidad de los espermatozoides o defectos de tipo morfológico; desprendimiento de cabeza y vacuolización del acrosoma. La tinción Giemsa permite determinar la presencia de células inflamatorias, aunque el hallazgo de las mismas no es un signo patognomónico de la enfermedad.

La muestra de semen se colorea con tinción Stamp y ante la presencia de microorganismos sospechosos, la muestra se siembra en medio selectivo y se incuba en una atmósfera de 5 a 10% de CO₂, debiendo ser examinada durante diez días antes de dar un cultivo por negativo (Blasco, 1990). Los medios de cultivo deben enriquecerse con suero bovino o equino (Estein, 1999).

La gran desventaja de este método de diagnóstico es que la eliminación de brucelas en el semen puede ser intermitente. Además, los cultivos son especialmente complejos en el caso de *B. ovis*. Por otra parte es un método que resulta poco práctico si se debe aplicar a un alto número de muestras.

Métodos serológicos: Los anticuerpos involucrados en las pruebas son de la clase IgG. Las pruebas más eficientes y usadas actualmente para el control de la enfermedad son Fijación del Complemento (FC), Inmunodifusión doble en Gel de Agar (ID) y ELISA (OIE, 2004). La OIE y la Unión Europea reconocen a la FC como prueba internacional para el diagnóstico; sin embargo ha sido demostrado que la ID posee similar sensibilidad y es más simple de realizar (OIE, 2004). Por otro lado numerosos estudios han demostrado que la prueba de ELISA es más sensible y específica que la FC e ID, aunque aún no ha sido estandarizada. La FC presenta desventajas tales como la ocurrencia de anti-complementariedad y hemólisis de los sueros; además, requiere del uso de agentes altamente lábiles (López *et al.*, 2005).

La ID se caracteriza por ser sencilla, de fácil interpretación y de bajo costo; sin embargo, es una prueba cualitativa y de menor sensibilidad que la técnica de ELISA. Una combinación de ambas daría resultados más certeros en términos de sensibilidad.

Recientemente se han realizado trabajos que analizan el uso de ELISA para determinar la presencia de anticuerpos en muestras de leche ovina, utilizando antígenos de *B. ovis* y de *B. canis*. Las muestras de leche son más fáciles de extraer, trasladar y manejar que los sueros sanguíneos (López *et al.*, 2005).

El antígeno más empleado de *B. ovis* es el obtenido a partir de la extracción en salina caliente, rico en LPS-R y en proteínas principalmente del grupo 3 de la membrana externa (OIE, 2004). Además se describe otro método para la obtención de un antígeno rico en LPS-R y con una muy baja cantidad de proteínas; éste utiliza una mezcla de petróleo, éter y fenol para realizar la extracción del LPS-R (Galanos *et al.*, 1969). La OIE recomienda como fuente de antígeno usar la cepa *B. ovis* REO 198, independiente de CO₂ y sugiere además el uso de varios biotipos de *B. ovis* para la fabricación de antígenos.

La comparación de una técnica diagnóstica serológica, como ID, con antígenos obtenidos de diferentes cepas de *B. ovis*, permitiría señalar cuál antígeno sería más sensible, permitiendo así una mejor detección de la infección.

3. HIPÓTESIS

Se espera que al enfrentar en la prueba de ID sueros de carneros infectados con dos cepas diferentes de *B. ovis* exista una mayor seroreactividad al utilizar el antígeno homólogo, es decir el preparado a partir de la misma cepa de inoculación.

4. OBJETIVO GENERAL

Contribuir al diagnóstico serológico de la epididimitis del carnero, a través de prueba de ID, comparando diferentes antígenos de *B. ovis*.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener un antígeno polisacárido-proteico a partir de la cepa estándar *B. ovis* 63/290.
2. Obtener un antígeno polisacárido-proteico de *B. ovis*, a partir de una cepa nativa chilena.
3. Evaluar, en el tiempo, mediante la prueba de ID ambos antígenos frente a los antisueros de dos carneros infectados experimentalmente con *B. ovis*, uno con la cepa estándar 63/290 y otro con una cepa nativa.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 MATERIAL

6.1.1 Cepas

Se utilizaron dos cepas diferentes de *B.ovis*, una estándar y la otra aislada de la zona central de Chile.

- *B. ovis* estándar 63/290 ATCC 25840 adquirida en el National Veterinary Services Laboratory, Ames, Iowa, E.E.U.U.
- *B. ovis* nativa de la zona de Til Til (V Región de Chile), aislada en el Laboratorio de Microbiología Clínica de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, desde lesiones epididimarias de un carnero positivo a la prueba de ID. Este animal, a su vez, era parte de un rebaño infectado con *B. ovis*.

6.1.2 Antígenos

Se utilizaron dos antígenos solubles, obtenidos de igual modo, a través del método de extracción salina en caliente propuesto por Alton *et al.* (1988).

- Antígeno soluble LPS-R de *B. ovis* cepa estándar 63/290.
- Antígeno soluble LPS-R de *B. ovis* cepa nativa Til Til.

6.1.3 Sueros de ovinos inoculados experimentalmente

Se emplearon un total de 108 muestras de sueros, 54 de cada uno de dos carneros inoculados experimentalmente en forma simultánea y en iguales condiciones. Las muestras de sangre fueron extraídas en los mismos días para ambos animales. Las muestras del día cero correspondieron a los sueros de ambos animales previo a las inoculaciones y las restantes 53 muestras de cada animal fueron obtenidas una vez a la semana post inoculación (p.i), con excepción de las semanas 47, 53, 54, 56, 57, 58, 59 en que no se extrajeron muestras hasta la semana 60 p.i, fecha en que se dio por finalizada la observación.

6.1.4 Suero control positivo

Se usó un pool de sueros de carneros positivos a *B. ovis* por ID. Estos animales, además, presentaban lesiones epididimarias y provenían de un rebaño con alta tasa de positividad a brucelosis ovina.

6.2 MÉTODOS

6.2.1 Preparación de Antígenos

A partir de cada una de las cepas de *B. ovis* se obtuvieron antígenos solubles mediante el método descrito por Alton *et al.* (1988) con algunas modificaciones. La extracción salina consistió en cultivar *B. ovis* en medio sólido enriquecido con suero bovino estéril, a 37° C y una atmósfera de 10% de CO₂, por un periodo de 72 hrs. La cosecha bacteriana se hizo con solución salina tope. Luego se lavaron las células tres veces con la misma solución y centrifugaciones a 5000 x g durante 30 minutos a 4° C. La masa bacteriana obtenida fue pesada y resuspendida en 4.2 veces el volumen en ml. de su peso en gramos con solución salina tope. Esta suspensión se sometió a baño termostático de 80° C por una hora. Posteriormente se centrifugó a 6000 x g durante 1 hora a 4° C; el sobrenadante obtenido se dializó contra una solución salina tope, de recambio diario, durante 4 días a 4° C en constante agitación. Finalmente se recolectó el antígeno obtenido, se alícuotó y congeló a -20° C hasta su uso. Este proceso se realizó con cada una de las dos cepas.

Para estimar el contenido proteico de cada antígeno se utilizó el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

6.2.1 Obtención de sueros

Se inocularon experimentalmente dos carnerillos sanos de 3 meses de edad, negativos a epididimitis del carnero por prueba de ID, uno con la cepa de *B. ovis* estándar 63/290 y el otro, con la cepa nativa de *B. ovis* Til Til. Ambos animales fueron mantenidos en corrales separados sin contacto entre ellos, bajo similares condiciones ambientales y de alimentación. La inoculación se realizó simultáneamente por las vías conjuntival (1ml) y prepucial (13ml). La cepa TilTil correspondió a $3,94 \times 10^8$ ufc/ml; en tanto que para la cepa 63/290 el conteo

fue de $2,45 \times 10^8$ ufc/ml.

Semanalmente, a partir de la inoculación y las siguientes semanas, se obtuvieron muestras seriadas de sangre por un periodo de 19 semanas. Posterior a la semana 19 se realizó una segunda inoculación o “booster” (cepa 63/290 $1,5 \times 10^9$ y cepa Til Til 3×10^8), continuándose las sangrías semanales, con excepción de 7 semanas en que no se extrajeron muestras, hasta llegar a la semana 60, correspondiente a los 420 días del total de la experiencia. Los sueros fueron almacenados en congelación a -20°C hasta su uso.

6.2.3 Prueba de Inmunodifusión doble en gel de agar

Esta técnica se realizó según la metodología de Myers (1973) con algunas modificaciones: se utilizaron 3ml de agarosa 0.8% en tampón Sorensen (pH 7.2-7.3) sobre un portaobjeto de 76 x 26 mm. previamente barnizado con agar al 2%. Se utilizó un sistema de roseta de seis perforaciones de 4 mm de diámetro, periféricas y equidistantes entre si por 3 mm para los sueros y una central de igual diámetro para el antígeno. Por roseta, el suero control positivo se empleó en tres pocillos, intercalados con tres sueros problema. Cada pocillo se cargó con 30ul de reactante.

La incubación se realizó en cámara húmeda a temperatura ambiente y la lectura de bandas de precipitación se efectuó a las 24, 48 y 72 horas de incubación, con interpretación final a las 72hrs. La especificidad de las bandas se determinó luego de someter los portaobjetos a un baño de inmersión en citrato de sodio al 5% durante 30 minutos.

La lectura de los resultados se efectuó sólo si los controles positivos presentaron banda de precipitación. Se interpretó como suero positivo la existencia de una banda de precipitación entre el suero problema y el antígeno, con identidad parcial o total con los sueros controles positivos contiguos. Se interpretó como suero negativo la ausencia de banda de precipitación en los sueros problemas.

Los resultados sospechosos correspondieron a la ausencia de banda nítida de precipitación y a la presentación en los extremos de las líneas contiguas de los sueros control positivo, de una inflexión o pequeña curva hacia el interior de la roseta.

Figura 1. Sistema de roseta utilizado en la inmunodifusión.

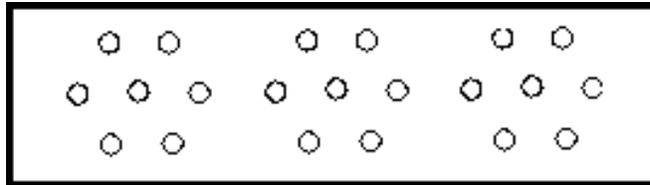
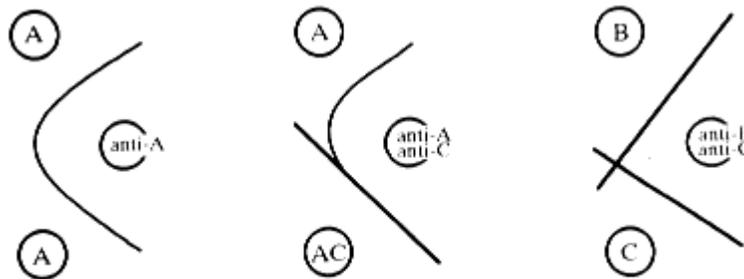


Figura 2. Reacciones de identidad, identidad parcial y no identidad.



6.2.4 Análisis Estadístico:

Se utilizó “el índice de concordancia de kappa” que expresa la proporción de concordancia (o de acuerdo) más allá del azar entre tratamientos distintos, es decir entre el Antígeno 63/290 y el TilTil.

El cálculo del valor de kappa se obtuvo a partir de la construcción de tablas de contingencia de 3 x 3 para las 24, 48 y 72 hrs. de resultados. Y posterior aplicación de la formula: $Z = K / \text{error estándar (K)}$ para determinar el valor de Z. Cuando el valor de Z es mayor a 1,96 se consideró una diferencia estadística significativa (Fleiss, 1973).

Además se graficaron los resultados en forma porcentual para las 24, 48 y 72 hrs. de lectura de la prueba.

7. RESULTADOS

En la cosecha de *B. ovis* cepa 63/290 se obtuvo 4.11 gramos de células húmedas de un total de 16 botellas “Roux”, mientras que de la cepa Til Til se obtuvo sólo 2.5 gramos de células de un total de 17 botellas. Estos datos concuerdan con el menor y más lento desarrollo observado en las placas y botellas sembradas con la cepa Til Til.

Los antígenos obtenidos, al aplicar el método de Lowry, dieron como resultado las siguientes concentraciones proteicas: 1.1 mg/ml de proteína para el antígeno 63/290, y 1.4 mg/ml para el antígeno Til Til.

Al realizar la prueba de inmunodifusión doble a los sueros de ambos carneros, obtenidos entre las semanas 0 a 19, se observó negatividad en todos los casos.

Posterior a la segunda inoculación (semana 19), el carnero inoculado con *B. ovis* cepa Til Til frente al Ag. 63/290 dio resultados sospechosos durante 3 semanas (semanas 22 a 24), seguido de positividad durante 23 semanas (semanas 25 a 48) y nuevamente sospechosos durante 5 semanas (semana 49 a 55); un control posterior, en la semana 60, resultó negativo (Tabla 1).

Al enfrentar los mismos sueros del carnero inoculado con *B. ovis* cepa Til Til, esta vez con el Ag. Til Til, se observó positividad, durante 9 semanas (semana 27 a 35); continuando como sospechosos 15 semanas (semana 36 a 50). Entre las semanas 51 a la 60 los resultados fueron negativos (Tabla 2).

En el caso del carnero inoculado con *B. ovis* cepa 63/290 se determinó que, posterior a la segunda inoculación, los sueros continuaron negativos tanto frente al Ag. Til Til como al Ag. 63/290 durante todo el periodo de observación hasta la semana 60 p.i. (Tablas 3 y 4). Es decir los 53 sueros enfrentados a ambos antígenos no presentaron reactividad alguna.

A continuación, se muestran los resultados luego de realizar la prueba de inmunodifusión a los sueros animales obtenidos post segunda inoculación, es decir, a partir de la semana 19 hasta la semana 60.

Tabla 1: Resultados ID a las 24, 48 y 72 hrs. de sueros de carnero inoculado con *B. ovis* cepa TilTil, frente al Ag. de *B. ovis* cepa 63/290, a partir de la segunda inoculación (semana 19).

Semana	Tiempos de lectura ID		
	24 Hrs.	48 Hrs.	72 Hrs.
19	-	-	-
20	-	-	-
21	-	-	-
22	-	-	sospechoso
23	-	-	sospechoso
24	-	-	sospechoso
25	+	+	+
26	+	+	+
27	+	+	+
28	+	+	+
29	+	+	+
30	+	+	+
31	+	+	+
32	+	+	+
33	+	+	+
34	+	+	+
35	+	+	+
36	+	+	+
37	+	+	+
38	+	+	+
39	+	+	+
40	-	+	+
41	-	+	+
42	-	+	+
43	-	+	+
44	-	+	+
45	-	+	+
46	-	+	+
48	-	+	+
49	sospechoso	sospechoso	sospechoso
50	sospechoso	sospechoso	sospechoso
51	sospechoso	sospechoso	sospechoso
52	sospechoso	sospechoso	sospechoso
55	sospechoso	sospechoso	sospechoso
60	-	-	-

Tabla 2: Resultados ID a las 24, 48 y 72 hrs. de sueros de carnero inoculado con *B. ovis* cepa Til Til, frente al Ag. de *B. ovis* cepa Til Til, a partir de la segunda inoculación (semana 19).

Semana	Tiempos de lectura ID		
	24 Hrs.	48 Hrs.	72 Hrs.
19	-	-	-
20	-	-	-
21	-	-	-
22	-	-	-
23	-	-	-
24	-	-	-
25	-	-	-
26	-	-	-
27	-	sospechoso	+
28	-	sospechoso	+
29	-	sospechoso	+
30	sospechoso	sospechoso	+
31	sospechoso	sospechoso	+
32	sospechoso	sospechoso	+
33	sospechoso	sospechoso	+
34	sospechoso	sospechoso	+
35	sospechoso	sospechoso	+
36	-	sospechoso	sospechoso
37	-	sospechoso	sospechoso
38	-	sospechoso	sospechoso
39	-	sospechoso	sospechoso
40	-	sospechoso	sospechoso
41	-	sospechoso	sospechoso
42	-	sospechoso	sospechoso
43	-	sospechoso	sospechoso
44	-	sospechoso	sospechoso
45	-	sospechoso	sospechoso
46	-	sospechoso	sospechoso
no	-	sospechoso	sospechoso
48	-	sospechoso	sospechoso
49	-	sospechoso	sospechoso
50	-	sospechoso	sospechoso
51	-	-	-
52	-	-	-
55	-	-	-
60	-	-	-

Resultados análisis estadístico:

El estudio para determinar si existía concordancia significativas entre los antígenos de *B. ovis* 63/90 y Til Til, solo se realizó para los resultados de los sueros del carnero inoculado con *B. ovis* cepa Til Til, ya que el carnero inoculado con la cepa 63/290 presentó solo resultados negativos. Se encontró que no existen concordancias entre el uso de ambos antígenos a las 24 o 72 hrs. de lectura de la prueba (Cuadros 1 y 3); solo se determinó concordancia a las 48 hrs. de lectura (Cuadro 2).

Cabe destacar, sin embargo, que esta concordancia encontrada corresponde a un Z marginalmente significativo o moderado.

A continuación se presentan, los análisis de concordancia de kappa a través de las tablas de contingencia.

Cuadro 1. Resultados a las 24 hrs. de lectura para el carnero inoculado con *B. ovis* cepa TilTil:

		Antígeno estándar 63/290		
		+	-	+/-
Antígeno T.T	+	0	0	0
	-	9	15	5
	+/-	6	0	0

Total: 35

Kappa: 0.079

E.s: 0.072

z = 1,097

Cuadro 2. Resultados a las 48 hrs. de lectura para el carnero inoculado con *B. ovis* cepa TilTil:

		Antígeno estándar 63/290		
		+	-	+/-
Antígeno T.T	+	0	0	0
	-	2	7	3
	+/-	21	0	2

Total: 35

Kappa: 0.113

E.s: 0.056

$z = 2,01$

Se considera a z marginalmente significativo al aplicar la prueba de Kappa,

Cuadro 3. Resultados a las 72 hrs. de lectura para el carnero inoculado con *B. ovis* cepa TilTil:

		Antígeno estándar 63/290		
		+	-	+/-
Antígeno T.T	+	9	0	0
	-	2	4	6
	+/-	12	0	2

Total: 35

Kappa: 0.184

E.s: 0.096

$z = 1,92$

Gráfico 1.

Resultados porcentuales prueba ID a través del tiempo de observación para el carnero Inoculado con *B. ovis* Cepa Til Til, Usando Ag 63/290

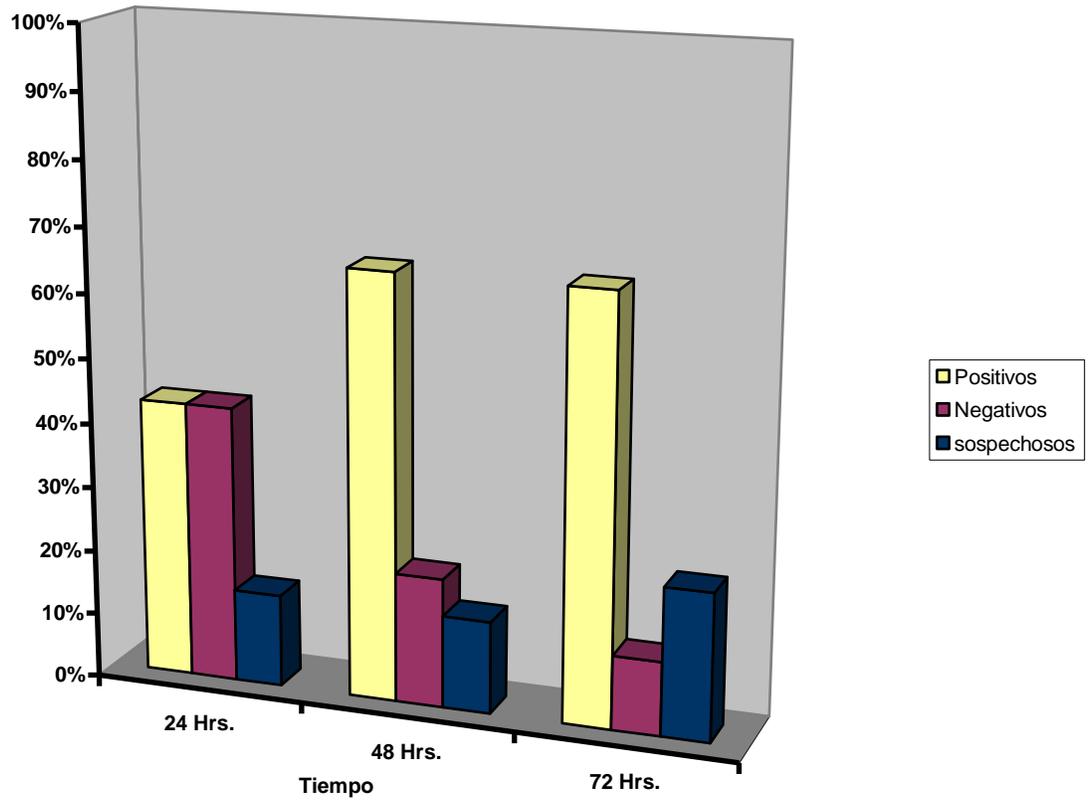


Gráfico 2.

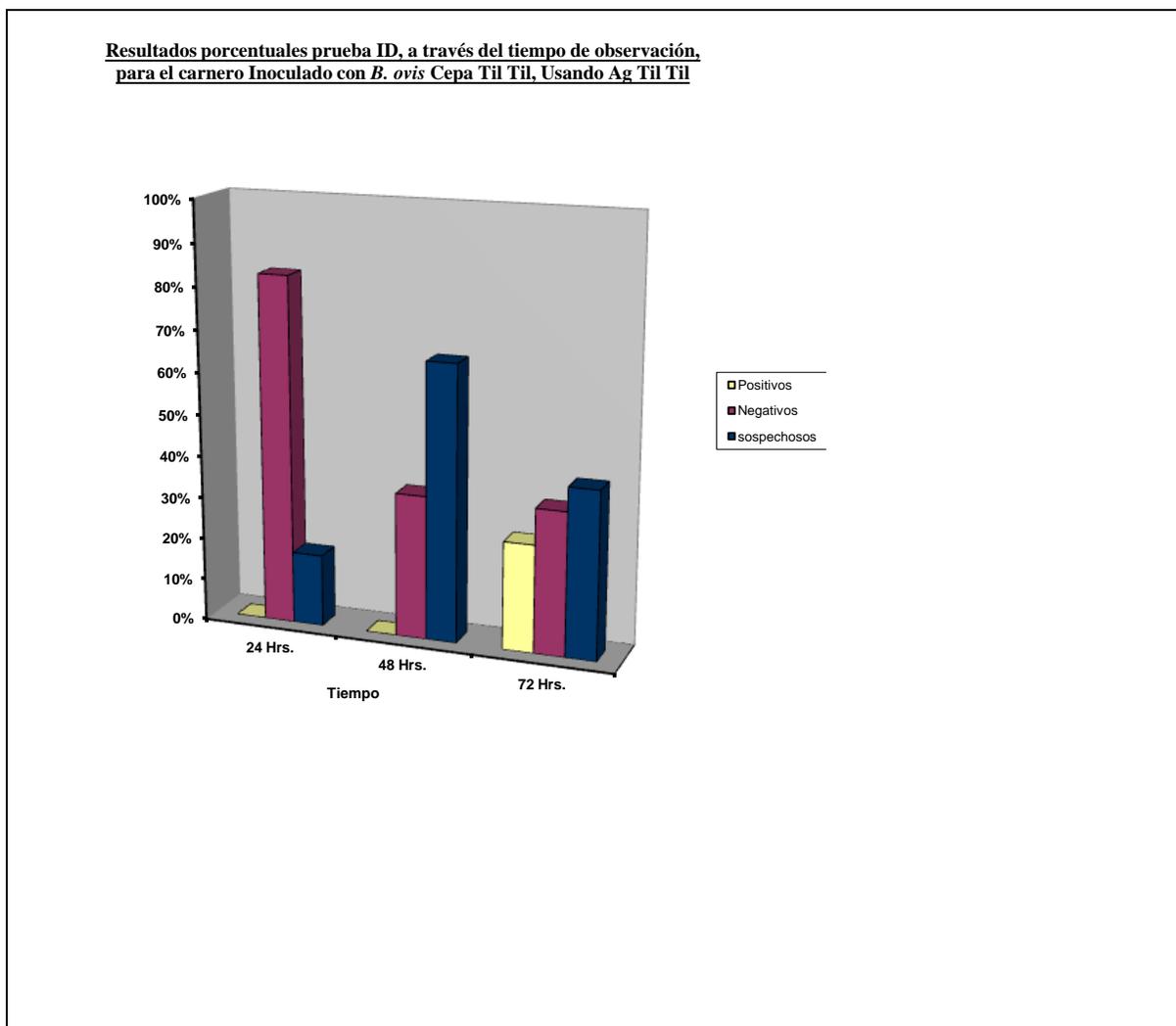


Tabla 3.

Prueba ID carnero inoculado con <i>B. ovis</i>, Cepa Til Til		
	Antígeno 63/290	Antígeno Til-Til
Positivos	65,71%	25,71%
Sospechosos	22,86%	40,00%
Negativos	11,43%	34,29%

8. DISCUSIÓN

El diagnóstico de laboratorio de la epididimitis del carnero se basa principalmente en el uso de técnicas indirectas serológicas, ya que los cultivos bacterianos, además de ser de lento desarrollo y exigir requerimientos específicos de medios y condiciones de cultivo, pueden resultar falso negativos en el caso de animales infectados, como ocurre con la muestra de semen, en que *B. ovis* puede ser eliminada en forma intermitente en éste.

Los métodos serológicos permiten utilizar variadas técnicas y antígenos, lo que determina tener diferencias en la sensibilidad y la especificidad entre las distintas pruebas diagnósticas que se utilizan. En el diagnóstico de brucelosis en otras especies animales, como es la bovina, existen pruebas serológicas ya estandarizadas, situación que no ocurre para la epididimitis causada por *B. ovis* en ovinos.

La prueba oficial recomendada por la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) para el diagnóstico de la Epididimitis del carnero es la fijación del complemento (FC); sin embargo, ésta presenta ciertas desventajas con respecto a otras pruebas serológicas, tales como la anticomplementariedad que caracteriza a muchos sueros ovinos, el tener que contar con reactantes lábiles que requieren de constante titulación y, de personal idóneo. Debido a esto, se utilizan otras técnicas alternativas a la FC como son la inmunodifusión doble en gel de agar (ID, AGID) y el enzimo-inmuno-ensayo (ELISA).

La ID es una técnica de bajo costo, sencilla y fácil de realizar a diferencia de la prueba de ELISA; en esta última el resultado depende mucho del antígeno empleado y requiere de mayor infraestructura para su implementación. Sin embargo, la sensibilidad y especificidad de ambas técnicas son relativamente similares (OIE, 2004). Recientemente la mayoría de los estudios sugieren a ELISA como una prueba de mayor sensibilidad y especificidad que la ID (López *et al.*, 2005).

La ID requiere de antígenos solubles que pueden variar en su constitución según la cepa bacteriana utilizada y la metodología de extracción; junto a ello influye, en los

resultados, la ejecución e interpretación de la técnica.

Se ha descrito que las diferencias que existen entre cepas de campo y cepas estándares de *B. ovis* radican, principalmente, en las proteínas de membrana externa (Ridler et al., 2005). Se han usado diversas técnicas moleculares para diferenciar los genes que codifican dichas proteínas; sin embargo, resulta interesante probar si, a través de técnicas diagnósticas como la ID es factible diferenciar antígenos solubles de diferentes cepas, a través de sus capacidades de reconocer anticuerpos contra infecciones producidas por diferentes cepas de *B. ovis*.

Esto es lo que se intenta demostrar al emplear en este trabajo dos cepas de *B. ovis*, una cepa estándar como es la 63/290 y la cepa TilTil como cepa de campo nativa.

Los antígenos de *B. ovis* obtenidos a través del método de extracción en salina caliente (HS), se caracterizan por ser ricos en lipopolisacárido rugoso (LPS-R) y en proteínas externas de membrana, principales componentes antigénicos de la bacteria. Este complejo HS se considera como el más adecuado para utilizar como antígeno en la ID para el diagnóstico de la Epididimitis del carnero (OIE, 2004; Muñoz *et al.*, 2005).

La obtención salina en caliente de los antígenos solubles de las cepas de *B. ovis* 63/290 y Til Til, utilizados en el presente trabajo, se realizó de manera similar, siguiendo la misma metodología de extracción para ambos; por lo tanto, esto aseguraría con cierta confiabilidad, que ambos antígenos serían comparables entre sí. A pesar de ser de una misma especie, entre ambas cepas pueden existir ciertas diferencias en las estructuras antigénicas de las proteínas externas de la membrana bacteriana, tanto del grupo 3 como del grupo 2; así Ridler *et al.* (2005) atribuyen especialmente a las de este último grupo la divergencia entre cepas estándares y de campo (Cloeckaert *et al.*, 1996; Ridler *et al.*, 2005).

Al realizar la determinación de la proporción de proteínas presente en los antígenos, el resultado para este componente estructural resultó ser casi similar para ambos, levemente superior para el antígeno Til Til; sin embargo, esto no significa que sean necesariamente

proteínas antigénicas, pero sí revela una diferencia estructural entre ambas cepas. El contenido de polisacárido presente en cada uno de los antígenos no se determinó, pudiendo existir diferencias en las proporciones o características de éste entre ambas cepas, que explicarían de algún modo las diferencias de comportamiento entre ambos antígenos frente a los mismos sueros.

La lectura y evaluación de cualquier antígeno en una prueba diagnóstica debe, en forma indispensable, dar positivo al enfrentarse a un antisuero reconocidamente positivo, para darle algún valor a la prueba. Los comportamientos tanto del Ag. 63/290 como del Ag. Til Til frente al pool de sueros usado como control positivo fueron similares, detectando ambos positividad y valorando así la prueba. Sin embargo, es importante destacar que la línea de precipitación dada por el Ag. Til Til fue levemente más tenue que la otorgada por el Ag. 63/290.

El determinar tiempos de lectura de 24, 48 y 72 hrs. de incubación para la prueba de ID, orienta acerca de las diferentes concentraciones de reactantes Ag-Ac; así una reacción de lectura positiva a las 24 hrs. revelaría una mayor concentración de anticuerpos que una positiva a las 48 o 72 hrs. El equilibrio entre concentraciones de reactantes es fundamental para la visualización de líneas de precipitación; lo esperado es una banda positiva nítida y centrada entre los pocillos de ambos reactantes (Ag y suero). Como las placas que presentaron alguna banda de precipitación fueron sometidas a un tratamiento de inmersión con citrato de sodio, cuyo objetivo es borrar las líneas inespecíficas dadas por complejos Ag-Ac de poca afinidad, esto nos permite asegurar que las líneas de precipitación que persistieron a este tratamiento, son específicas del complejo Ag-Ac de *B. ovis*.

A la luz de los resultados negativos obtenidos en el caso del carnero inoculado con la cepa de *B. ovis*. 63/290, se podría pensar que no hubo infección, sin embargo ésta se comprobó al realizar una prueba de ELISA a estos mismos sueros, los cuales sí presentaron tasas de anticuerpos detectables¹(*), confirmándose de esta manera la menor sensibilidad que posee la ID en relación a ELISA (López *et al.*, 2005). El resultado negativo podría también explicarse porque la cepa 63/290 puede haber perdido en parte su virulencia y

¹ (*)Cristian Nuñez, trabajo de memoria no publicada.

capacidad infectante, debido a su adaptación a las condiciones de cultivo *in vitro* de laboratorio, induciendo una muy débil producción de anticuerpos no detectables por ID; al respecto, cabe señalar que las dos concentraciones bacterianas y vías de inoculación utilizadas en éste y el otro animal son las recomendadas por la literatura para lograr la infección experimental en ovinos (Blasco, 1990; Radostits *et al.*, 1999).

En cuanto al carnero inoculado con *B. ovis* cepa Til Til, sus sueros fueron capaces de reaccionar por ID frente a ambos antígenos, 63/290 y Til Til; pero solo después de recibir la segunda inoculación de la cepa. Estos mismos sueros al ser sometidos a la prueba de Elisa presentaron anticuerpos detectables a partir de la primera inoculación²(*). Este resultado permite señalar que, a diferencia de lo ocurrido con el carnero inoculado con la cepa 63/290, en este caso sí hubo infección detectable por esta prueba diagnóstica luego de un “booster” (Tablas 1 y 2).

Es importante destacar que se observaron diferencias en el comportamiento de ambos antígenos frente a los mismos sueros del carnero Til Til. Si consideramos que las lecturas finales de la inmunodifusión se realizan a las 72 horas de incubación, el Ag. 63/290 detectó la infección dos semanas antes que el Ag. Til Til, es decir a partir de la semana 25 (Tabla 2) versus semana 27 (Tabla 1). Se suma a esto que este Ag 63/290 detectó positividad de los sueros durante un período continuo de 23 semanas, mientras que el Ag Til Til lo hizo por un período mas breve, de sólo 9 semanas seguidas. Junto a la diferencia de positividad en el tiempo, dada por ambos antígenos a las 72 horas de lectura, también se observaron diferencias en los tiempos de observación a las 24 y 48 horas lectura de la prueba, siendo el Ag 63/290 capaz de detectar positividad, con reacciones claras, a partir de las 24 hrs., mientras que el Ag Til Til otorgó lecturas positivas claras sólo a las 72hrs. de realizada la prueba de ID.; por lo mismo, el antígeno Til Til clasifico más sueros sospechosos que el Ag 63/290. Esto se aprecia en los gráficos 1 y 2 donde el primero, correspondiente al Ag 63/290, muestra un aumento de la proporción de positivos entre las 24 a 48 hrs, que se mantiene en 65% de positividad para las 72 hrs. de lectura. El gráfico 2, correspondiente al Ag. Til Til, muestra positividad sólo a las 72 hrs. y en un porcentaje bajo

² (*)Cristian Nuñez, trabajo de memoria no publicada.

de 25%, siendo la proporción de sospechosos la mas alta para las 48 y 72 hrs de lectura.

Los resultados indican que el Ag. 63/290 detecta tasas más bajas de Ac. que el Ag. Til Til, siendo más sensible para el diagnóstico de la infección producida por *B. ovis* cepa Til Til que el antígeno homólogo de dicha cepa, es decir el Ag. Til Til.

Esto llama bastante la atención ya que al ser mas sensible el Ag. 63/290 para diagnosticar la infección producida por *B. ovis* cepa Til Til, la hipótesis planteada inicialmente sería rechazada, siendo en este trabajo el Ag. heterólogo el que entregó mejores resultados.

La cepa 63/290, a pesar de no producir una infección como la lograda con la cepa de campo Til Til, al ser utilizada como antígeno para el diagnóstico funcionaría mejor según los resultados obtenidos en el presente trabajo.

El análisis estadístico solo revela que a las 48 hrs. de lectura de la prueba de ID existiría una leve concordancia entre los resultados de ambos antígenos.

Resulta importante recalcar que los carneros, a pesar de haber recibido dos estímulos antigénicos, al final del tiempo de experimentación de 420 días sus sueros fueron negativos a la ID; esto en términos prácticos significaría que si existe positividad serológica, esta no es capaz de mantenerse en el tiempo, como ocurre en vacas positivas a *B. abortus*. Se concluye así que un solo examen serológico negativo no constituiría diagnóstico definitivo de epididimitis del carnero. Esto último también se debe tener presente al momento de aplicar planes de control de la enfermedad, en cuanto a repetir el diagnóstico en el tiempo. Se sabe que los carneros en condiciones naturales se montan entre si, existiendo por lo tanto en los rebaños positivos una reinfección constante entre ellos; al respecto, la situación de los carneros aquí inoculados experimentalmente fue diferente por cuanto siempre permanecieron aislados entre ellos y no recibieron otro estímulo antigénico que los inóculos conocidos.

El comportamiento variable de las dos cepas de *B. ovis* utilizadas, tanto en términos de inmunógenos como de antígenos, induce a pensar que pueden existir, además de la cepa Til Til aislada de la V región, otras cepas nativas con características diferentes en otras

regiones del país. De acuerdo a esto sería interesante realizar aislamientos y estudios de otras cepas, especialmente en la XII Región que concentra la mayor parte de la masa ovina nacional, y así tener un mejor conocimiento de las posibles variantes de cepas de *B. ovis* nacionales y seleccionar junto a otras estándares, las de mejor comportamiento como antígenos para contribuir efectivamente a un mejor diagnóstico de la enfermedad y con ello a su control.

Es difícil establecer actualmente qué es más conveniente para el país, si usar una cepa estándar para antígeno o una cepa nacional. Según los resultados aquí obtenidos, trabajando con solo dos cepas, la estándar 63/290 fue más adecuada en este caso para detectar la infección producida por la cepa de campo nacional Til Til. Una de las características del desarrollo de *B. ovis* en laboratorio es su dependencia de CO₂, situación que hace engorrosa la obtención de antígenos. La existencia de la cepa estándar REO 198, que se diferencia de la 63/290 por no necesitar CO₂ para su desarrollo, facilita su manejo a nivel de laboratorio y aunque es recomendada por la OIE como antígeno, debiera también ser evaluada y comparada con aislamientos nacionales.

Frente a un escenario nacional poco definido para el control de la epididimitis del carnero, y que más aún revela importantes diferencias en resultados serológicos al enviar las mismas muestras a distintos laboratorios, resulta fundamental el estudio y determinación de las mejores técnicas y antígenos para el control de la infección, para así lograr una producción ovina más competitiva no sólo en términos de productividad, sino que también en términos de calidad sanitaria.

9. CONCLUSIONES

- Entre las cepas *B. ovis* 63/290 y *B. ovis* Til Til se observa diferencia inmunogénica y antigénica.
- El antígeno *B. ovis* 63/290 detecta mejor que el antígeno *B. ovis* Til Til la infección experimental de ovino con la cepa heteróloga *B. ovis* Til Til, rechazándose así la hipótesis planteada.
- La positividad serológica post inoculación experimental no es permanente en el tiempo.

10. BIBLIOGRAFÍA

- **AFZAL, M.; TENDERDY, R. P., SQUIRE, P. G.; ELLIS, R.** 1984. Characterization of *Brucella ovis* lipopolysaccharide and its use for the diagnosis of ram epididymitis by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 20: 1159-1164.

- **ALEGRÍA, G.; RIVAS, M; MUÑOZ, B.; CRUZ, N.** 1968. Aislamiento de *Brucella ovis* en Chile. *Zooiatría* 9: 8-12.

- **ALTON, G. G.; JONES, L. M.; ANGUS, R. D.; VERGER, J. M.** 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France.

- **BLASCO, J.M.** 1990. *Brucella ovis*. In: Animal Brucellosis. K. Nielsen & J. R. Duncan. Boca de ratón, FL: CRC press. Pp. 351-378.

- **BOWDEN, R. A.; CLOECKART, A.; ZIGMUNT, M. S.; BERNARD, S.; DUBRAY, G.** 1995. Outer membrane protein and rough lipopolisacharide specific monoclonal antibodies protect mice against *Brucella ovis*. *Journal of Med. Microbiology.* 43: 344-347.

- **CARTER, G.R.; CHENGAPPA, M.M.; ROBERTS, A.W.** 1995. Essentials of veterinary microbiology. 5th edition. Williams and Wilkins. Baltimore, USA. Pp: 199-203.

- **CLOECKART, A.; VERGER, J. M.; GRAYON, M.; VIZCAINO, N.** 1996. Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*. Federation of European Microbiological Societies, FEMS Microbiology Letters 145: 1-8.

- **CLOECKART, A.; VERGER, J. M.; GRAYON, M.; PAQUET, J-Y.; GARIN-BASTUJI, B. ; FOSTER, G.** 2001. Classification of *Brucella spp.* isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp2 locus. *Microbes Infect.* 3: 729-738.

- **CLOECKART, A.; VIZCAÍNO, N.; PAQUET, J-Y.; BOWDEN, R.; ELZER, P.** 2002. Major outer proteins of *Brucella spp.* Past, present and future. *Veterinary Microbiology* 90: 229-247.

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

- **FLEISS, J. L.** 1973. *Statistical Methods for Rates and Proportion.* John Wiley & Sons. Pp: 140-153.

- **GALANOS, C.; LUDERITZ, O.; WESTPHAL, O.** 1969. A New Method for the Extraction of R Lipopolysaccharides. *European J. Biochem.*9: 245-249.

- **GAMAZO, C.; WINTER, A. J.; MORIYÓN, I.; RIEZU-BOJ, J. L.; BLASCO, J. M.; DÍAZ, R.** 1989. Comparative analyses of proteins extracted by hot saline or released spontaneously into outer membrana blebs from field strains of *Brucella ovis* and *Brucella melitensis*. *Infect. Immun.* 57: 1419-1426.

- **GARCÍA, G.** 1998. Manejo de los ovinos. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Imprenta Antumapu. P: 117.

- **GRILLÓ, M.J.; MARÍN, C.M.; BARBERAN, M.; BLASCO, J.M.** 1999. Experimental *Brucella ovis* infection in pregnant ewes. *Veterinary Record* 144:555-558.

- **INE. INSTITUTO NACIONAL ESTADISTICA.** 2000. http://www.ine.cl/ine/canales/chile_estadistico/estadisticas_economicas/agropecuarias/xls/2005/censoagropecuario. (consulta: 06-04-2006).

- **JIMENEZ DE BAGÜES, M. P.; ELZER, P. H.; BLASCO, J. M.; GAMAZO, C., WINTER, A.J.** 1994. Protective immunity to *Brucella ovis* in BALB/c mice following recovery from primary infection or immunisation with subcellular vaccines. *Infect. Immun.* 62: 632-638.

- **KIMBERLING, C. V.** 1988. Epididymitis. *In: Jensen and Swift`s Diseases of sheep.* 3th Edition. Ed. Lea & Febiger. Philadelphia, USA. Pp: 7-10; 54.

- **LOPEZ, 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*. *Veterinary Microbiology* 105:181-187.
- **LOWRY, O. H.; ROSEMBROUGH N. J.; FARR A. & RANDALL R. J.** 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biology and Chemical*. 193:265-275.
- **MEYER, M. E.** 1990. *Brucella*. In: Review of Veterinary Microbiology. Biberstein, E. L; Zee, Y.C. Blackwell Scientific Publications, USA. Pp:213-218.
- **MUÑOZ, P.; ESTEVAN, M.; MARÍN, C.; DE MIGUEL, M.J.; GRILLÓ, M.J.; BARBERAN, M.; IRACHE, J.; BLASCO, J.M.; GAMAZO, C.** 2005. *Brucella* outer membrane complex-loaded microparticles as a vaccine against *Brucella ovis* in rams. *Vaccine* 24:1897-1905.
- **MURILLO, M.; GOÑI, M.M.; IRACHE, J.M.; ARANGO, M.A.; BLASCO, J.M.; GAMAZO, C.** 2002. Modulation of the cellular immune response after oral or subcutaneous immunization with microparticles containing *Brucella ovis* antigens. *Journal of Controlled release* 85:237-246.
- **MYERS, D.M.** 1973. Field evaluation of the gel diffusion test for the diagnosis of ram epididymitis caused by *Brucella ovis*. *Apl. Microbiology*. 26: 855-857.
- **OIE. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES.** 2004. World Organisation for Animal Health. Manual of Standards Diagnostic Test and Vaccines. 4th Edition. Chapter 2.4.1: Ovine Epididymitis (*Brucella ovis*).
- **ORELLANA, M.** 1982. Brucelosis ovina: Modificaciones de algunas características del semen, en carneros infectados experimentalmente con *Brucella ovis*. Tesis M.V., Universidad de Chile. Escuela de Medicina Veterinaria. Santiago, Chile.
- **PINOCHET, L. ; PINTO D AGUIAR, A.; SANCHEZ, M. L; BERTOLINO, R.** 1987. Brucelosis ovina. Vacunación con cepa 45/20 adyuvante. *Avances en Ciencias Veterinarias*. 2(1): 47-50.
- **PINOCHET, L. ; SANCHEZ, M. L; ABALOS, P.** 1981. Brucelosis. Monografías de Medicina Veterinaria. 3(2): 44-80.

- **PINTO D AGUIAR, A.; PINOCHET, L; CREMPIEN, C.; LOPETEGUI, P.** 1986. Brucelosis ovina: Estudio de prevalencia en hembras y su relación con la infección en carneros. III Congreso Nac. Med. Vet. Santiago. 038.

- **RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W.** 1999. Medicina Veterinaria. Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. Novena edición. Mc Graw-Hill. Madrid, España. Vol. I. Pp: 1042-1045.

- **RIDLER, A. L.; WEST, D.M.; STAFFORD, K. J.; WILSON, P. R.; FENWICK, S.G.** 2000. Transmission of *Brucella ovis* from rams to red deer stags. N. Z. Vet. J. 48: 57- 59.

- **RIDLER, A. L.** 2001. *Brucella ovis* infection in deer. Surveillance 28; 6-8.

- **RIDLER, A.L.; LEYLAND, M.J.; FENWICK, S.G.; WEST, D.M.;** 2005. Demonstration of polymorphism among *Brucella ovis* field isolates by pulsed-field gel electrophoresis. Veterinary Microbiology 108: 69-74.

- **RIEZU- BOJ, J. I.; MORIYON, I.; BLASCO, J. M.; GAMAZO, C.; DÍAZ, R.** 1990. Antibody response to *Brucella ovis* outer membrana proteins in ovine brucellosis. Infect. Immu. 58: 489-494.

- **ROJAS, X.; ALONSO, O.; ROSENFELD, C.; URIBE, C.; FERNANDEZ, V.** 1990. Brucelosis ovina. Situación actual en explotaciones pequeñas de una comuna del sur de Chile. Arch. Med. Vet. XXII, 1: 55-63.

- **SANCHEZ, M. L.; MATAMALA, L.; BORIE, C.; MORALES, M. A.** 2006. Estudio descriptivo de diagnósticos del laboratorio de Microbiología Clínica Veterinaria de la Universidad de Chile. XX Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias/ 14° Congreso Chileno de Medicina Veterinaria. Abstract N° 497.13-16 Noviembre. Santiago. Chile.

- **SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO (SAG).** 2004. http://www.sag.gob.cl/pls/portal/docs/PAGE/PG_SAG_BIBLIOTECA/BIBL_SANIDAD/BIBLI_SANANIMAL/BIBLIO_SANANI_INFORMES/SITUACION_SANITARIA_CHILE_2004_TABLA_RESUMEN.PDF.

- TAMAYO, R.; VALENTIN, H.; SCHOEBITZ, R. 1989. Determinación de anticuerpos a *Brucella ovis* en ovinos de la X Región de Chile. Arch. Med. Vet., XXI, (1): 22-27.