



UNIVERSIDAD DE CHILE

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



**EPIDIDIMITIS DEL CARNERO (*Brucella ovis*): DIAGNÓSTICO
COMPARATIVO ENTRE INMUNODIFUSIÓN DOBLE EN GEL DE
AGAR Y CONTRAINMUNOELECTROFORESIS**

MATÍAS IGNACIO QUEVEDO PINTO

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

PROFESOR GUÍA: CONSUELO BORIE POLANCO

**SANTIAGO, CHILE
2007**



UNIVERSIDAD DE CHILE

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



**EPIDIDIMITIS DEL CARNERO (*Brucella ovis*): DIAGNÓSTICO
COMPARATIVO ENTRE INMUNODIFUSIÓN DOBLE EN GEL DE
AGAR Y CONTRAINMUNOELECTROFORESIS**

MATÍAS IGNACIO QUEVEDO PINTO

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

NOTA FINAL:.....

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA	CONSUELO BORIE:
PROFESOR CONSEJERO	PEDRO ABALOS:
PROFESOR CONSEJERO	LUIS MORAGA:

**SANTIAGO-CHILE
2007**

ÍNDICE

	Página
Resumen.....	2
Summary.....	3
Introducción.....	4
Revisión Bibliográfica.....	5
Objetivos.....	26
Materiales y Métodos.....	27
Resultados.....	33
Discusión.....	37
Conclusiones.....	42
Bibliografía.....	43
Anexos.....	47

RESUMEN

La epididimitis contagiosa del carnero es una enfermedad bacteriana del ovino producida por *Brucella ovis* (*B. ovis*), que afecta mayormente el aparato genital de hembras y machos, siendo estos últimos los principales hospederos. Esta enfermedad es de importancia para la explotación ovina, debido a las pérdidas económicas y reproductivas producidas por abortos en ovejas e infertilidad en los carneros.

Las estrategias de control de la enfermedad están basadas en un buen diagnóstico, por lo que es esencial contar con métodos de alta sensibilidad y especificidad que sean económicos y fáciles de realizar. El objetivo de este trabajo es implementar la técnica de Contrainmunolectroforesis (CIEF) para el diagnóstico de epididimitis contagiosa del carnero y compararla con la prueba de Inmunodifusión Doble en gel de agar (ID)

Se implementó la técnica de CIEF, realizando la lectura a las 24 horas y utilizando, al igual que en la ID, antígeno LPS-r de *B. ovis*. Se analizaron 243 sueros de carneros seropositivos y 243 sueros de carneros seronegativos por ID. Además, se analizaron por ambas pruebas 2 carneros infectados experimentalmente, de los que se obtuvo sangre semanalmente hasta las 58 semanas post-infección. La CIEF mostró tener una sensibilidad de 82.71% (201/243) y una especificidad de 77.36% (188/243) al ser comparada con ID, con un índice de concordancia *Kappa* de 0.6, sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre ambas pruebas. Por otra parte, en los dos carneros infectados experimentalmente, ambas pruebas fueron capaces de detectar la presencia de anticuerpos desde la 4^a hasta la 58^a semana post-infección. Finalmente, se puede decir que la CIEF no mostró diferencias significativas al ser comparada con la ID, obteniendo sensibilidad y especificidad mayores al 75%. La principal ventaja de la CIEF sobre la ID es la significativa disminución en el tiempo que demora en detectar la formación de bandas de precipitación (24 hrs. v/s 72 hrs).

SUMMARY

Contagious ram epididymitis is an infectious-contagious disease produced by *Brucella ovis* (*B. ovis*) that mostly affects the reproductive tract of ewes and rams. Rams are the mayor host of the bacteria. This disease is important to ovine flocks due to the economic and reproductive losses produced by abortion in ewes and infertility in rams.

Control strategies are based in a good diagnostic, therefore it is esential to have easy, economic and highly sensitive and specific diagnostic methods. The objetive of this study was to develop the Counterimmuno-electrophoresis (CIE) technique for the diagnosis of contagious ram epididymitis and to compare it with Gel Diffusion test (GD).

The CIE technique was developed as a diagnostic procedure for Ram Epididymitis caused by *Brucella ovis*. The technique was conducted with 24 hours interpretation and using *B. ovis* R surface antigen. Two hundred and fourty three seropositive ram sera and 243 seronegative ram sera by GD were analyzed. Furthermore, samples from 2 experimentally infected rams were collected weekly for 58 weeks and analyzed by GD and CIE. The sensitivity of the CIE test was 82.71% (201/243), in addition, the specificity of the CIE was 77.36% (188/243), with 0.6 concordance *Kappa* index. The results obtained by CIE did not show statistical differences with those obtained by GD. On the other hand, both techniques were capable to detect precipitin formation in the 2 experimentally infected rams from week 4 to week 58 post-infection. As a conclusion, CIE results did not show statistical differences with those obtained by GD, with sensitivity and specificity values over 75%. The main advantage of CIE over GD consists in a significant reduction of the time required to detect precipitin formation (24 hours v/s 72 hours).

INTRODUCCIÓN

La brucelosis en la especie ovina es una enfermedad bacteriana de gran importancia en los planteles de explotación de esta especie a nivel mundial. Aunque esta patología puede ser producida por diferentes especies del género *Brucella*, *Brucella ovis* (*B. ovis*), especie no zoonótica de este género, es el agente etiológico de mayor importancia en nuestro país. Afecta principalmente a machos, aunque también puede afectar a las hembras, en las que produce abortos esporádicos; mientras que en los primeros produce la llamada “Epididimitis Contagiosa del Carnero”, enfermedad caracterizada por una inflamación del epidídimo y una disminución en la motilidad y viabilidad de los espermatozoides, con la consecuente disminución de la fertilidad. Esto último conduce a pérdidas económicas en los planteles las que, si bien no han sido estudiadas en profundidad, son consideradas de importancia.

Cabe destacar que la epididimitis contagiosa del carnero no presenta una sintomatología específica y que, debido a la existencia de un gran número de enfermedades que producen alteraciones testiculares, el diagnóstico clínico mediante palpación no es certero, siendo el aislamiento bacteriano la única forma de diagnóstico definitivo de la enfermedad. Sin embargo, dado que la excreción de *B. ovis* es intermitente, un animal con cultivo negativo no necesariamente indica que esté libre de infección.

Por lo anterior, y sumado al gran número de animales por plantel, es que se hace indispensable un método de diagnóstico de laboratorio indirecto fácil, rápido, económico y de alta sensibilidad y especificidad.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La brucelosis en la especie ovina es una enfermedad infectocontagiosa producida principalmente por dos especies del género *Brucella*: *Brucella melitensis* (*B. melitensis*) y *Brucella ovis* (*B. ovis*), aún cuando, en forma esporádica, se han descrito casos por *Brucella abortus* (*B. abortus*) (Ocholi *et al.*, 2005). La primera especie es zoonótica, pertenece al grupo de las llamadas brucelas lisas y no es de importancia en Chile ya que el país se declaró libre de ella en 1987 (Corbel, 1997), situación que se mantiene actualmente (SAG, 2006a). La segunda, es una especie no zoonótica y pertenece, junto con *Brucella canis* (*B. canis*), al grupo de las brucelas rugosas. El carácter liso o rugoso radica en la presencia o ausencia, respectivamente, de la cadena O (polisacárido, homopolímero de N-formilperosamina) del lipopolisacárido (LPS), componente exclusivo de la membrana externa de las bacterias gram negativas (Blasco y Gamazo, 1994).

Brucella ovis fue descrita por primera vez en 1952, y corresponde a un cocobacilo Gram negativo, acapsulado y que carece de flagelos; crece en medios enriquecidos con suero animal y en una atmósfera con 5-10% de CO₂. Sus colonias, visibles luego de un periodo de incubación de 3 a 5 días, son pequeñas, circulares, de borde liso y superficie granular. La morfología rugosa de *B. ovis* se puede apreciar en forma directa a través de iluminación oblicua donde las colonias aparecen de color amarillo, con aspecto seco, granular y opaco (Estein, 1999).

Estructuralmente, las bacterias del género *Brucella* presentan una envoltura celular trilaminar constituida por una membrana interna o citoplasmática, separada de la membrana externa (ME) por un espacio periplásmico rico en proteínas solubles y péptidoglicano (PG)

(Estein, 1999). En la membrana externa se encuentran el lipopolisacárido rugoso de membrana (LPS-r) o el lipopolisacárido liso (LPS-s) (en las especies rugosas y lisas respectivamente) y las proteínas de membrana externa (PME). Todos ellos se encuentran expuestos en la superficie de la ME, presentando epitopos accesibles para anticuerpos monoclonales (Estein, 1999).

El LPS-r es una molécula compleja de bajo peso molecular compuesto por un glicolípido (lípidio A) y un núcleo glicosídico. El lípidio A está formado por glucosamina y diaminoglucosa, que en sus grupos amino e hidroxilo presentan sustituciones por ácidos grasos de longitud de cadena variable. El núcleo está formado por el ácido 2-ceto-3-desoxioctanoico (KDO), manosa y glucosa (Blasco y Gamazo, 1994).

La membrana externa presenta dos grupos de proteínas que se dividen en mayores y menores de acuerdo a su abundancia y se hallan en estrecha relación con el LPS-r. Dentro del primer grupo se encuentran las proteínas Omp2b, Omp25 y Omp31, estas dos últimas son predominantes en *B. ovis*. Las proteínas menores son las denominadas Omp10, Omp16 y Omp19 (Estein, 1999).

Recientemente se identificaron dos proteínas: una de 26 kDa (denominada BP26) en el espacio periplasmático, y una de 18 kDa, específica del género *Brucella*, que se encuentra en el citoplasma (Estein, 1999). Esta especificidad hace que no presente reacciones cruzadas con otras bacterias Gram negativas como, por ejemplo, *Yersinia enterocolítica*, lo que permitiría su utilización como antígeno en pruebas diagnósticas (Goldbaum *et al.*, 1993).

La brucelosis ovina por *B. ovis*, afecta principalmente el aparato genital de hembras y machos. En la hembra, si no se encuentra gestante, se puede producir una vaginocervicitis

y endometritis; durante la gestación, se produce placentitis y muerte fetal o nacimientos de corderos débiles debido a una bacteriemia que ocurre generalmente a partir de la segunda mitad de la gestación (Estein, 1999).

En el caso de los machos, la infección recibe el nombre de epididimitis contagiosa del carnero, debido a que corresponde a su manifestación clínica más común, caracterizada por una inflamación crónica con aparición de granuloma espermático en epidídimo, vesícula seminal y/o ampolla ipsilateral (Estein, 1999). Además de esto, disminuye la calidad del semen, el número y motilidad de los espermatozoides, lo que se traduce finalmente en esterilidad.

En orden de importancia, la transmisión ocurre a través de monta homosexual y heterosexual. Durante la temporada no reproductiva, los machos son criados en rebaños separados de las hembras, lo que hace que se mezclen animales enfermos con jóvenes susceptibles. Esta situación permite que los machos se monten entre ellos depositando semen en el recto y, posiblemente, perineo de los carneros montados. Otros machos pueden montar el mismo carnero en rápida sucesión. Además de lo anterior, durante un ciclo estral, una hembra puede ser montada por varios machos y recibir depósitos de semen de cada uno (Kimberling, 1988).

De esta forma, la bacteria presente en el semen puede penetrar las membranas mucosas del recto de machos montados, la vagina de hembras montadas, el pene y prepucio de machos reproductores y la nariz y boca de crías lactantes (Kimberling, 1988). Una vez dentro del cuerpo, se desconocen cuales son los sistemas específicos de inmunidad frente a *B. ovis*, aunque se sabe que, si bien debieran asemejarse a los observados frente a *B. abortus*, los roles de la inmunidad humoral y celular, más que ser equivalentes, difieren en una mayor participación de los anticuerpos en el caso de *B. ovis*. Es decir, mientras que en

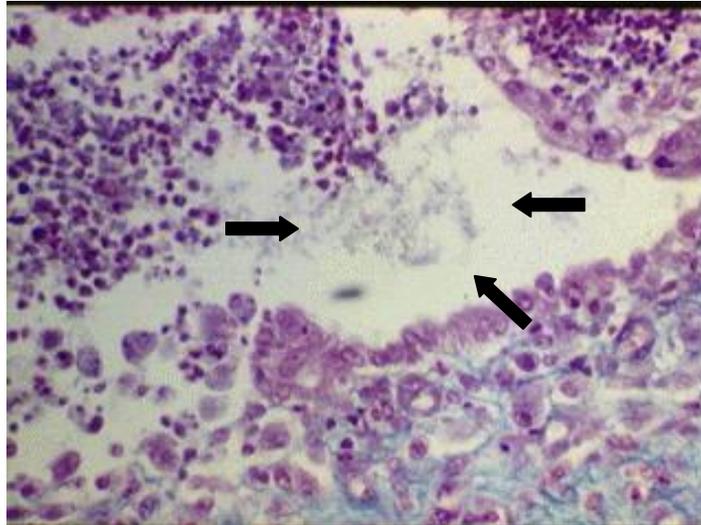
la infección por *B. abortus* la inmunidad celular desempeña un rol fundamental, en la infección por *B. ovis* parece ser la inmunidad humoral la predominante (Jiménez de Bagüés *et al*, 1994a).

Cualquiera sea el método de transmisión, la enfermedad comienza en la membrana mucosa. El agente penetra el linfonodo local a través de vasos linfáticos aferentes. En este sitio produce hiperplasia de las células reticuloendoteliales y luego pasa a la sangre, desde donde se difunde a todos los órganos y se localiza en el epidídimo, vesículas seminales, glándulas bulbouretrales y ámpulas. Esta bacteriemia desaparece luego de dos meses, mientras que la infección puede permanecer hasta por cuatro años (Kimberling, 1988).

Como otras infecciones por brucelas, *Brucella ovis* es rápidamente fagocitada, pero ha desarrollado distintas estrategias para sobrevivir a la degradación intracelular de los macrófagos (Chin y Pang-Turner, 1990). Cuando la bacteria es fagocitada, el sistema de defensa insta la fusión del fagosoma con los lisosomas para formar el fagolisosoma, organelo que contiene la mayoría de los agentes tóxicos bactericidas. Pero *Brucella* puede permanecer en el fagosoma intacto y bloquear la fusión posterior con el lisosoma. Se cree que en las cepas lisas, el polisacárido O tendría un importante rol en este mecanismo. Además de lo anterior, la bacteria debe resistir la acción de intermediarios del oxígeno (peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilos), formados en el fagocito durante la explosión respiratoria que acompaña la fagocitosis. Se sabe que enzimas como la catalasa y la superóxido dismutasa, presentes en el género *Brucella*, participan en los sistemas de defensa frente a la toxicidad oxidativa (Blasco y Gamazo, 1994). Esta sobrevivencia intracelular probablemente otorgue un mecanismo para evadir la vigilancia inmunológica, permitiendo que cuando la bacteria alcance el sistema reproductor se inicie una fase proliferativa (Chin y Pang-Turner, 1990).

Una vez que *B. ovis* llega al epidídimo se producen una serie de cambios alrededor del sitio de infección: se comienzan a acumular fluidos en el espacio intersticial, los plasmocitos y linfocitos se agrupan alrededor de los vasos sanguíneos; los leucocitos migran, junto con la bacteria hacia el ducto del epidídimo (Fotografía N°1); las células epiteliales del epidídimo se hiperplasian, produciendo obstrucción del conducto, con lo que se desarrolla una inflamación de la pared. Cerca del sitio de oclusión se acumulan masas de espermátidas y se extravasan al tejido intersticial. Todo esto provoca una inflamación, lo que termina en granulomas. Luego de la oclusión completa del conducto, los túbulos seminíferos se degeneran y el testículo se atrofia. Desafortunadamente, parece ser que el órgano blanco, más que el epidídimo, son las glándulas vesiculares, por lo que se hace difícil diagnosticar a través de la palpación de las lesiones del epidídimo, ya que no todos los animales las presentan. Las lesiones tempranas se hacen detectables luego de un periodo de incubación de dos a ocho semanas, y las lesiones agudas varían desde un suave engrosamiento e induración del epidídimo sin involucrar los testículos hasta inflamaciones severas y extremadamente dolorosas del contenido escrotal (Kimberling, 1988).

Los carneros afectados tienen libido normal y la calidad del semen varía en cuanto a número de espermatozoides, leucocitos, bacteria, motilidad y número de cabezas desprendidas (Kimberling, 1988; Orellana, 1982).



Fotografía N°1. *Brucella ovis* en epididimitis. Las flechas señalan la presencia de bacterias. Fuente: Bristol Biomedical Image Archive, University of Bristol.

En la necropsia se pueden encontrar cambios como adherencia de la túnica vaginal al epidídimo. En los estadios tempranos de la enfermedad, el epidídimo se puede encontrar levemente engrosado mientras que el testículo se encuentra de tamaño normal; en estados tardíos, el epidídimo se encuentra considerablemente engrosado y más firme, en tanto que el testículo se encuentra atrófico y suave. Las vesículas seminíferas están aumentadas de tamaño y firmes (Kimberling, 1988).

Histopatológicamente, el tejido intersticial presenta fibroplasia y frecuentemente granulomas espermáticos. El canal epididimario se puede encontrar dilatado y con espermátidas y leucocitos. En el epitelio no es extraño encontrar cistitis mural, mientras que los túbulos seminíferos se pueden encontrar con distintos grados de atrofia (Kimberling, 1988).

En la ámpula del conducto deferente se pueden encontrar distintas alteraciones, como focos de necrosis en el epitelio y neutrófilos entre las células epiteliales, al igual que

lo que ocurre en las vesículas seminales. Los cambios epiteliales pueden ir desde hiperplasia hasta picnosis (Kimberling, 1988).

La importancia que tiene la infección por *B. ovis*, en los rebaños de explotación ovina está dada principalmente por las pérdidas económicas que ésta ocasiona, ya que puede afectar la producción de carne, leche y lana (Arévalo, 2004). Estas pérdidas, de acuerdo a la literatura revisada, si bien no han sido bien evaluadas en términos de cifras, se estiman de importancia. Además de lo anterior, hay que sumar las pérdidas genéticas producidas debido a los abortos en las hembras y la esterilidad en los machos.

La enfermedad por esta bacteria se encuentra distribuida mundialmente, encontrándose en países como Francia, Alemania, España, Sudáfrica, Argentina, Uruguay, Australia y Nueva Zelanda (OIE, 2004). En Chile no se han realizado mayores investigaciones sobre prevalencia, pero un estudio realizado por Arévalo (2004) en 25 predios de la undécima región, encontró un 34% de positividad entre 876 carneros analizados mediante la prueba de enzimoimmunoensayo (ELISA) indirecto y además, el 52% de los predios presentaba al menos un animal positivo. Estas cifras no distan mucho de lo encontrado en la casuística del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, donde desde el año 1995 hasta el 2002 se analizaron 2212 muestras de sueros ovinos, encontrándose 583 sueros positivos, lo que corresponde a un 26.36% de las muestras (Matamala, 2006). En este periodo, se analizaron muestras procedentes de 10 predios, donde todos presentaron al menos un animal seropositivo por ID.

El diagnóstico es de suma importancia en todo plan de control de epididimitis del carnero, ya sea para eliminar la infección de un plantel positivo como para evaluar el estado sanitario del plantel frente a la enfermedad.

El diagnóstico se puede realizar de distintas maneras, dentro de las que se incluyen el diagnóstico clínico, el directo y los métodos indirectos. El diagnóstico clínico se realiza en machos, y se basa en la palpación escrotal en busca de procesos inflamatorios, pero, debido a que aproximadamente un 50% de los animales infectados con *B. ovis* no desarrollan una epididimitis palpable (Estein, 1999) este examen resulta de escasa utilidad. Si se considera además el número de animales por plantel, se hace poco práctico, engorroso y lento. Además, el diagnóstico clínico es extremadamente inespecífico debido a la existencia de muchas otras bacterias que causan epididimitis clínica, tales como *Actinobacillus seminis*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *B. melitensis* y *Chlamydomphila abortus* (antes *Chlamydia psittaci*) (OIE, 2004). Se debe enfatizar que muchas lesiones epididimales palpables en corderos son granulomas espermáticos estériles inducidos por trauma (OIE, 2004). El diagnóstico diferencial debe considerar la epidídimo-orquitis, abscesos y varicocele. Algunas de estas enfermedades son clínicamente indiferenciables (Kimberling, 1988).

El único método definitivo de diagnóstico es el aislamiento de la bacteria. Si el análisis es post-mortem, las muestras deben ser tomadas de preferencia desde epidídimo, vesículas seminales, ámpula y linfonodos inguinales en machos, el útero y los ganglios supramamario e iliaco en hembras, mientras que en el feto abortado las muestras de preferencia se toman de contenido abomasal y pulmones (OIE, 2004). Para mejorar la sensibilidad del cultivo microbiológico se deberían examinar todos los linfonodos (bazo, craneal, escapular, pre-femoral y testicular) (OIE, 2004). Para el aislamiento desde

animales vivos, las muestras pueden ser obtenidas desde muestras de leche, tórulas vaginales o desde el semen de animales infectados (OIE, 2004), sin embargo, dado que su eliminación es intermitente y puede incluso no existir, un cultivo negativo no es suficiente para descartar la infección (Ficapal *et al.*, 1998). Como una medida complementaria al cultivo, las muestras pueden ser teñidas para observación en microscopio mediante el método de Stamp o Gram (OIE, 2004), con lo que se puede observar el cocobacilo característico, sin embargo, otras bacterias con morfología similar, o con características tintoriales similares podrían estar presentes en las muestras, haciendo inapropiado el diagnóstico sólo por métodos tintoriales. Para mejorar la eficiencia del diagnóstico directo, el cultivo se realiza en medios selectivos para *Brucella*, entre ellos, el más recomendado es el medio Thayer-Martin modificado (OIE, 2004). Básicamente consiste en una base de Agar Chocolate (GC Medium) suplementado con hemoglobina, colistina, vancomicina, nitrofurantoina, nistatina y amfotericina (OIE, 2004). El desarrollo bacteriano ocurre normalmente luego de 3-4 días, pero un cultivo no debe darse por negativo hasta el séptimo día. Las colonias son de 0.25 a 2.5 mm de diámetro y son redondas, convexas y de tipo rugoso cuando se ven por iluminación oblicua (OIE, 2004). *B. ovis* carece de actividad de ureasa, no reduce nitrato a nitrito, es catalasa positivo y oxidasa negativo, no produce ácido sulfhídrico, y, aunque no crece en presencia de metil violeta, usualmente crece en presencia de concentraciones estándares de fucsina y tionina (OIE, 2004). El diagnóstico por cultivo, al igual que el diagnóstico clínico, presenta el inconveniente de que los planteles ovinos manejan, en general, un gran número de individuos, lo que hace que estos exámenes sean engorrosos, caros y poco prácticos.

Otro método directo estudiado durante los últimos años ha sido la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR), utilizando los partidores ISP1 e ISP2 ya que se encuentran

en múltiples copias en el ADN de *B. ovis* (Manterola *et al.*, 2003). Manterota *et al.* (2003) analizaron 56 muestras de semen de 14 animales infectados experimentalmente con *B. ovis* mediante inoculación conjuntival. Las muestras fueron obtenidas desde la 4^a a la 8^a semana post-inoculación. La infección fue confirmada mediante análisis bacteriológico post-mortem luego de las 8 semanas de la experiencia. Estas muestras fueron utilizadas para comparar la sensibilidad del PCR en comparación con el cultivo bacteriológico en medio Thayer-Martin modificado con un 10% de CO₂ e incubación a 37° C por 7 días. Los resultados demostraron que el cultivo fue capaz de detectar 23 muestras positivas, las que provenían de 10 de los 14 animales infectados experimentalmente. Esta cifra fue levemente superior a lo encontrado por PCR, que sólo fue capaz de detectar 19 muestras positivas; pese a lo anterior, los autores destacan que el PCR fue capaz de detectar los 10 animales positivos por cultivo en al menos una oportunidad (Manterota *et al.*, 2003). En el mismo estudio, se analizaron 101 muestras de semen de animales provenientes de predios infectados naturalmente con *B. ovis*. De estos animales, 52 fueron seropositivos según la prueba de Inmunodifusión Doble (ID) y Fijación del Complemento (FC). Sólo 26 (50%), de estos 52 sueros, fueron positivos al cultivo de semen en medio Thayer-Martin modificado. De estos 26 animales positivos a cultivo y pruebas serológicas, 22 (84.6%) fueron positivos por la prueba de PCR. Por otro lado, 5 animales seropositivos pero con cultivo negativo fueron positivos al PCR, situación que puede deberse a un sobrecrecimiento de contaminantes o a la presencia de brucelas muertas o no viables (Manterola *et al.*, 2003). Finalmente, 3 muestras negativas por serología y cultivo, fueron positivas por PCR. Los resultados demuestran que el PCR tiene una sensibilidad similar al cultivo, presentando principalmente la ventaja con respecto a este de poder detectar infección por *B. ovis* en muestras de semen contaminadas con otras bacterias o que contienen un bajo número de

ellas (Manterola *et al.*, 2003). Sin embargo, esta prueba continúa presentando el inconveniente de que la eliminación de *B. ovis* en el semen es intermitente, pudiendo incluso no existir (Ficapal *et al.*, 1998), lo que se reflejó en una sensibilidad relativa cercana a tan sólo un 50% al ser comparada con ID y FC (Manterola *et al.*, 2003).

Debido a los inconvenientes que presentan los métodos directos es que se han desarrollado métodos indirectos de diagnóstico, basados principalmente en la respuesta inmune celular y humoral que se produce en el hospedero.

Si bien la inmunidad celular a *Brucella* no ha sido bien estudiada en el carnero, ensayos en ratón permitieron establecer que aunque la inmunidad protectora contra *B. ovis* se asemeja a la producida contra *B. abortus* en bovinos, los roles de la inmunidad humoral y celular se orientan hacia una mayor participación de los anticuerpos en el caso del ovino (Jiménez de Bagüés *et al.*, 1994a). En un estudio realizado en ratones BALB/c que fueron vacunados con la cepa RB51 de *B. abortus* se encontró que al transferir suero de los ratones vacunados a ratones sin vacuna se aumentaba la respuesta humoral de estos últimos frente a una exposición posterior a *B. ovis*. Por el contrario, el traspaso de células T de los animales vacunados a los animales no vacunados, no produjo inmunidad alguna al ser desafiados con *B. ovis* (Jiménez de Bagüés *et al.*, 1994b). Esto probablemente se deba a que la respuesta humoral va orientada principalmente a las PME, algunas de las cuales son compartidas por especies lisas y rugosas del género *Brucella*; en tanto que la respuesta inmune celular va orientada principalmente a la cadena O del LPS de membrana, el que se encuentra ausente en las especies de tipo rugoso como *B. ovis* (Jiménez de Bagüés *et al.*, 1994b). De esto se desprende que la inmunidad humoral tendría un rol más importante que la celular en la protección del hospedero (ovinos), aunque aún no se conocen completamente las células implicadas en la respuesta inmune (Estein, 1999). Según Jiménez de Bagüés *et al.* (1994a),

el predominio de isotipos IgG2a e IgG3 en ratón permitiría inferir que *B. ovis* induce la población de linfocitos T colaboradores del tipo I (LTh1) productores de interferón γ . En trabajos realizados en *B. melitensis* (Durán-Ferrer *et al.*, 2004) se comparó la respuesta inmune de ovejas preñadas previamente vacunadas con la cepa Rev-1 frente a la respuesta presentada por ovejas preñadas sin vacunar que presentaban los signos de la enfermedad. Se evaluó indirectamente la respuesta inmune celular mediante la medición *in vitro* de interferón γ utilizando un “kit” comercial de ELISA que contiene anticuerpos monoclonales contra interferón γ recombinante bovino pero que producen reacción cruzada con interferón γ de otras especies, como la ovina. De esta forma, se observó que los altos niveles de producción de interferón γ tienen una alta relación con la infección activa por *B. melitensis*, aunque hay que tomar en cuenta que la infección fue experimental y que las conclusiones sólo pueden limitarse a hembras preñadas y no ser extrapoladas a hembras no preñadas o machos (Durán-Ferrer *et al.*, 2004). Además, los autores señalan que hacen falta mayores estudios en cuanto a sensibilidad y especificidad. De acuerdo a los resultados del ensayo descrito, sería interesante analizar la producción de interferón γ en animales infectados con *B. ovis* ya que, al momento de este estudio, no se encontró información de una investigación similar en animales infectados con esta bacteria.

La respuesta inmune humoral ha sido estudiada en la infección por *B. ovis*, con lo que se han podido identificar ciertos complejos antigénicos y su inmunodominancia en la respuesta humoral a esta bacteria. Estudios realizados por Riezu-Boj *et al.* (1986) mediante inmunoblot han demostrado que las PME tienen una participación tan importante como el LPS-r en la respuesta inmune humoral frente a *B. ovis*. En otro estudio, de 36 animales con aislamiento de *B. ovis* en semen, el 93% presentó anticuerpos contra PME del Grupo 3

(Peso Molecular 28.5kDa, 27kDa y 25.5kDa) mediante inmunoblot (Riezu-Boj *et al.*, 1990). Esto indica que la respuesta inmune humoral va dirigida principalmente contra el LPS-r y las PME del Grupo 3, ambos presentes en la superficie bacteriana (Estein, 1999).

Dentro de los métodos que se basan en la inmunidad humoral para diagnosticar la infección por *B. ovis* se encuentran las pruebas de Fijación del Complemento (FC), el Enzimoimmunoensayo (ELISA) y las pruebas de precipitación.

La prueba de Fijación del Complemento es la prueba oficial de la OIE para el diagnóstico serológico de Epididimitis del Carnero por *B. ovis* (OIE, 2004). La base de esta prueba es que mezclas de diluciones de sueros, antígenos y una cantidad fija de complemento obtenido de cobayo puedan o no activar la lisis de eritrocitos previa inactivación del complemento endógeno mediante calentamiento (30-60 minutos a 56°C). De esta forma, si existen anticuerpos en el suero, estos se unirán al antígeno y se activará el sistema del complemento, por lo que al agregar el indicador (eritrocitos de oveja sensibilizados con anticuerpos de conejo) no existirá complemento disponible y no ocurrirá lisis de los eritrocitos. De la misma manera, si el suero no contiene anticuerpos, el complemento disponible se activará mediante la interacción con los anticuerpos de conejo y los eritrocitos se lisarán, provocando la liberación de hemoglobina, la que puede ser medida mediante espectrofotometría. Esta prueba presenta dos variantes, la FC caliente y la FC fría, cuyos procedimientos son esencialmente los mismos, variando solamente los tiempos y temperaturas de incubación primarias (Nielsen, 2002). Se dice que la prueba fría es más sensible que la FC caliente, pero menos específica que la misma (OIE, 2004). En general, la FC presenta los inconvenientes de necesitar un gran número de reactivos y titulaciones de ellos (Nielsen, 2002), además es frecuente encontrar efectos anticomplementarios en el suero problema, es decir, el suero parece fijar el complemento

cuando no hay antígenos (Tizard, 1995). Esto se puede deber a que en un animal infectado cualquier complejo inmunitario se unirá a una cierta cantidad de complemento (Tizard, 1995). De la misma manera, si en el suero hay presencia de contaminantes bacterianos, se activará el complemento por la vía alternativa (Tizard, 1995). A lo anterior se debe sumar el hecho de que sueros hemolizados pueden dar resultados falsos negativos (Myers y Varela-Díaz, 1979).

Durante los últimos años el método de ELISA se ha utilizado en la detección de brucelosis ovina usando distintos compuestos antigénicos como LPS, y proteínas internas como la BP-26, proteína periplasmática de 26 kDa que se presenta altamente conservada en el género *Brucella* (Estein, 1999). El antígeno se deposita pasivamente en una matriz de poliestireno, seguido de suero diluido y anti-inmunoglobulina de ovino conjugada con una enzima (Nielsen, 2002; OIE, 2004). De acuerdo con un estudio realizado por Vigliocco *et al.* (1997), en 675 ovinos provenientes de tres predios libres de infección, la prueba de ELISA presentó mayor especificidad que la de FC (100% v/s 99.69%). El mismo estudio utilizó sueros de 28 animales con cultivo de semen positivo a *B. ovis* para determinar sensibilidad; el ELISA presentó una sensibilidad mayor que la prueba de FC (96.43% v/s 88.89%) y el índice de concordancia *Kappa* entre las dos pruebas fue de 0.79, lo que significa una fuerza de ajuste sustancial (Landis y Koch, 1977). En otro estudio se comparó la prueba de ELISA indirecto tomando como referencia la prueba de ID en 2828 sueros de machos ovinos. Se encontró que los valores de sensibilidad y especificidad relativa fueron de 72.3% y 94.5% respectivamente, con un índice de concordancia *Kappa* de 0.49 (Duvauchelle, 1994), es decir, una fuerza de ajuste moderada (Landis y Koch, 1977). López *et al.* (2005), compararon dos pruebas de ELISA en cuanto a sensibilidad y especificidad en 51 sueros (carneros) provenientes de un predio libre de infección por *B. ovis* y 32 sueros

(carneros) provenientes de un predio con infección natural comprobada por examen clínico, bacteriológico y serológico; el primer ELISA utilizaba antígeno de *B. canis* (especie rugosa que presenta antigenicidad cruzada con *B. ovis*), mientras que el segundo ELISA utilizó antígeno de *B. ovis*. Los resultados mostraron que ambas pruebas presentaron 100% de especificidad y sensibilidad, lo que permitiría su uso en forma indistinta (López *et al.*, 2005).

La desventaja que presenta el ELISA es la necesidad de tener un espectrofotómetro para la lectura de la placa, equipo que aumenta el costo inicial (Estein, 1999). Debido a la existencia de sueros negativos a ELISA pero positivos a ID, la combinación de ambas pruebas entregaría una sensibilidad óptima. Sin embargo, la combinación de FC con ELISA, no mejora la sensibilidad del ELISA por sí solo (OIE, 2004).

Las pruebas de precipitación se basan en la capacidad que tienen los anticuerpos de formar uniones tridimensionales con el antígeno, formando compuestos capaces de precipitar en geles de agar o agarosa. Dentro de este grupo se encuentra la prueba de Inmunodifusión Doble en gel de Agar (ID) y la Contraimmunoelectroforesis (CIEF). En la primera, se hacen pocillos en una matriz de agarosa, equidistantes de un pocillo central que se llena con antígeno mientras en los otros se deposita el suero sospechoso. De existir anticuerpos en los sueros, estos migrarán por la matriz y al encontrarse con el antígeno que migra de la misma manera formarán uniones covalentes que precipitan y pueden ser observadas a contraluz. La prueba ha sido descrita utilizando LPS-r como antígeno o un Extracto Salino (ES) que también contiene LPS-r (Nielsen, 2002; Manterola *et al.*, 2003). La prueba es usada ampliamente en la actualidad y es una alternativa diagnóstica aceptada por la OIE (Nielsen, 2002). Esta prueba se realiza en Chile utilizando ES como antígeno

(Sánchez, 2005*). Presenta las ventajas de ser sencilla, económica y de fácil interpretación. En cuanto a las desventajas se puede señalar que es una prueba cualitativa, no estandarizada (Estein, 1999), y lenta ya que se debe esperar 72 horas para ser interpretada (Duvauchelle, 1994). Un estudio realizado por López *et al.* (2005), plantea la posibilidad de reemplazar la ID por la Prueba de aglutinación rápida en placa (RSAT en inglés) utilizando antígeno de *B. canis* que, como se explicó con anterioridad, produce reacción cruzada con *B. ovis*. La RSAT consiste en mezclar diluciones de antisuero y antígeno en un portaobjetos por dos minutos y luego ver las muestras al microscopio con aumento de 10X; en caso de existir aglutinación, la muestra es positiva. Los resultados obtenidos por López *et al.* (2005) mostraron que de 32 sueros provenientes de 32 carneros de un predio con infección natural por *B. ovis* (comprobada mediante examen clínico, bacteriológico y serológico), la RSAT fue capaz de detectar los 32 sueros 100% como positivos, mientras que la ID detectó 31 (97%), en tanto que la variante de la RSAT que utiliza 2-mercapto-etanol (agente que elimina reacciones inespecíficas) detectó 29 sueros (91%). De esta forma la RSAT podría ser una buena alternativa a la ID previo estudio con número muestral mayor (López *et al.*, 2005).

La Contrainmunolectroforesis (CIEF) es otra técnica de precipitación, que se basa en que cuando algunos anticuerpos se someten a electroforesis en gel de agar, éstos se mueven hacia el cátodo debido a un flujo del buffer a través del agar. Este fenómeno se denomina electroendosmosis (Tizard, 1995). Si un antígeno tiene una fuerte carga negativa, de manera que se mueva hacia el ánodo a pesar de este flujo, entonces resulta posible

* Comunicación Personal con Dra. María Luisa Sánchez, Laboratorio de Microbiología Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias Universidad de Chile.

conducir juntos al antígeno y el anticuerpo por electroforesis (Tizard, 1995). La ausencia de grupos sulfato en las preparaciones de agarosa es importante, ya que estos grupos altamente cargados pueden unir y retardar la movilidad de ciertos antígenos (Anhalt *et al.*, 1978). Con la CIEF se obtiene una línea de precipitado en pocos minutos (Tizard, 1995).

La prueba se realiza en un gel de agar donde el pH se elige para que el anticuerpo este cargado positivamente y el antígeno negativamente (Steward y Male, 1998). Mediante la aplicación de voltaje a través del gel, el anticuerpo y el antígeno se mueven en dirección opuesta, se encuentran y precipitan (Steward, 1998). Esta prueba en sí presenta una mayor sensibilidad que la ID (10 y hasta 100 veces), ya que la reacción antígeno-anticuerpo ocurre en un área muy definida con muy poca difusión lateral (Anhalt *et al.*, 1978). La CIEF fue utilizada para el diagnóstico de Epididimitis del Carnero por Myers y Varela-Díaz (1979), quienes muestran resultados similares al ser comparada con ID y FC (sensibilidades de 97.02% y 95.83% respectivamente). La principal ventaja que presenta la CIEF frente a la ID es una reducción significativa del tiempo para detectar la formación de precipitinas (2 horas), además del ahorro en reactantes (Lasserre, 1984). A pesar de los buenos resultados de la CIEF observados por Myers y Varela (1979), no existen otros antecedentes publicados para el diagnóstico de esta enfermedad en ovinos. Sin embargo, existen antecedentes bibliográficos sobre esta prueba para el diagnóstico de brucelosis canina por *B. canis* (Lasserre, 1984), una brucela rugosa que comparte algunas estructuras antigénicas con *B. ovis*. La CIEF es la prueba actualmente utilizada en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile para el diagnóstico de Brucelosis canina debido a *B. canis*. Para esta prueba de rutina se utiliza el antígeno LPS-r de *B. ovis* obtenido mediante ES. En un estudio nacional, la prueba de CIEF para *B. canis* utilizando LPS-r de *B. ovis* ha mostrado resultados similares en cuanto a

especificidad (96.82%) y sensibilidad (100%) al ser comparada con la ID (Lasserre, 1984). En este mismo estudio se sugiere la posibilidad que la prueba de CIEF presente una sensibilidad incluso mayor que la ID, debido a que 2 de los animales resultaron negativos a ID pero positivos a CIEF, lo que disminuyó la especificidad (Lasserre, 1984).

El tratamiento de esta enfermedad se dificulta debido a que la bacteria se multiplica y sobrevive al interior del macrófago, complicando la acción de los antimicrobianos. La terapia debe considerar mantener concentraciones bactericidas por periodos prolongados además de usar antibióticos que sean capaces de traspasar la membrana de los macrófagos, es decir, lipofílicos (Estein, 1999). Debido a esto, y sumado al alto costo en mano de obra y materiales, es que el tratamiento no suele realizarse, excepto en animales de alto valor y en etapas tempranas de la enfermedad (Estein, 1999; Kimberling, 1988). La administración de 800mg.de clortetraciclina con 1 gr. de dihidroestreptomicina durante 3 semanas es capaz de eliminar la infección y mejorar la calidad del semen en algunos carneros (Kimberling, 1988); la asociación de oxitetraciclina con dihidroestreptomicina ha dado resultados satisfactorios eliminando la excreción de *B. ovis* por semen (Estein, 1999). En la Tabla 1 se presentan resultados de ensayos *in vitro*, realizados por Marín *et al.* (1996), que determinan Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) y Máximas Concentraciones que Permiten Crecimiento (CPC) de *B. ovis*.

Tabla 1. Valores de CMI y CPC ^a de *B. ovis* frente a antibióticos.

Antibiótico	CMI (µg/ml)	CPC (µg/ml)
Ácido Nalidixico (5) ^a	64	8
Bacitracina (25) ^a	64	4
Colistina (7.5) ^b	512	128
Ciclohexamida (100) ^a	512	256
Polimixina B (5) ^a	512	128
Vancomicina (20) ^a , (3) ^b	512	128
Nistatina (100) ^a , (12.5) ^b	512	256
Nitrofurantoina (10) ^b	512	128

(a) Los valores en paréntesis indican la concentración del respectivo antibiótico en el medio de Farrel.

(b) Los valores en paréntesis indican la concentración del respectivo antibiótico en el medio de Thayer-Martin modificado.

Es necesario aclarar que el ensayo de Marín *et al.* (1996) tuvo como objetivo el determinar la susceptibilidad antimicrobiana de *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. ovis* en dos medios de cultivo selectivos (Farrel y Thayer-Martin), más que relacionar dicha susceptibilidad con una posible aplicación terapéutica.

Siendo entonces una enfermedad de difícil tratamiento, las medidas de control toman una gran relevancia. La base del control de la Epididimitis del Carnero es la identificación y eliminación de los animales seropositivos y/o con epididimitis clínica, además de evitar la introducción de animales infectados en el plantel (Estein, 1999). También se propone la inmunización mediante la utilización de vacunas; en este punto, si bien se han investigado distintos tipos de vacunas, la más usada y recomendada es la Rev 1 de *Brucella melitensis* (OIE, 2004), vacuna no autorizada en Chile (SAG, 2006c). Para la identificación de animales positivos se recomienda la palpación de machos un mes antes

del servicio y obtención de muestra de sangre al menos una vez al año para determinar presencia de anticuerpos; además, algunos autores proponen la implementación de cultivo bacteriológico como complemento al examen clínico y “test” serológicos pre-servicio (Estein, 1999). En algunos países con baja incidencia de *B. ovis* se optó por la eliminación de todos los animales infectados; como es el caso de Australia, Canadá y Rumania (Estein, 1999). Otras medidas propuestas para un control efectivo incluyen (Kimberling, 1988):

1.- Separar carneros vírgenes de viejos que puedan estar infectados, jamás mezclarlos.

2.- Testear todos los animales luego de la temporada de cruza, durante el periodo de baja actividad sexual, eliminando los positivos. Repetir este procedimiento cada 45 a 60 días hasta que el predio se encuentre libre.

3.- Introducir animales nuevos al rebaño sólo luego de establecer su calidad de libres de infección (2 ELISA negativos en un periodo de 45 a 60 días).

En Chile, el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), a través de su Manual del Ganadero, plantea la siguiente estrategia de control (SAG, 2006b):

- Revisión clínica regular de los carneros.
- Extracción de sangre de todos los carneros para realizar pruebas serológicas.
- Eliminar los carneros con lesiones clínicas (aunque no todas sean por Brucelosis) y/o serología positiva o manejarlos en un piño aparte.
- Aislar inmediatamente los animales seropositivos y repetir serología en 30-60 días al resto de los carneros negativos por si estuvieran incubando la enfermedad.
- Mantener aparte los carneros de los carnerillos.

- Durante el periodo de encaste, los carnerillos no deben compartir el mismo rebaño de ovejas con los carneros adultos para evitar la infección.

Sin importar que estrategia de control se elija, se hace fundamental contar con métodos efectivos de diagnóstico, que posean una alta sensibilidad y especificidad, además de ser de bajo costo y fácil ejecución.

Hasta la fecha, en Chile son escasos los laboratorios que ofrecen el diagnóstico indirecto de epididimitis contagiosa del carnero. Básicamente utilizan las técnicas de FC, ELISA indirecto e Inmunodifusión Doble en gel de Agar, por tanto la implementación de técnicas alternativas sería un aporte para el diagnóstico de esta enfermedad.

Basados en los buenos resultados de la CIEF para el diagnóstico de Brucelosis canina por *B. canis* y según lo observado por Myers y Varela-Díaz (1979), se espera que la implementación de la CIEF con antígeno LPS-r de *B. ovis* tenga una sensibilidad y especificidad similar a la Inmunodifusión doble, aportando con ello una herramienta más para el control de la enfermedad en el país.

OBJETIVO GENERAL

- Implementar una técnica rápida de diagnóstico serológico para Brucelosis ovina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.- Implementar la técnica de Contrainmunolectroforesis con antígeno rugoso para el diagnóstico de Brucelosis ovina por *B. ovis*.

2.- Determinar sensibilidad, especificidad y concordancia de ésta técnica frente a Inmunodifusión Doble, realizada con el mismo antígeno.

3.- Determinar el tiempo que demoran ambas técnicas en detectar la formación de anticuerpos en ovinos experimentalmente infectados.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. EXPERIENCIA N°1: “Implementación de CIEF y análisis comparativo con ID”.

A.-Sueros ovinos:

1.- Suero control positivo obtenido por infección experimental de un carnero con una cepa estándar obtenida de CEPANZO y donado gentilmente por la Dra. María Luisa Sánchez (Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile).

2.- Sueros ovinos: Se utilizaron los sueros recibidos por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, entre los años 2000 y 2005. Las muestras fueron confirmadas por la técnica de Inmunodifusión Doble en Agar con antígeno LPS-r de *B. ovis*, de acuerdo a la técnica de rutina del Laboratorio. Esto, debido a que los sueros han permanecido en congelación a -20°C por al menos un año, pudiendo haber disminuido sus precipitinas.

3.- Tamaño Muestral: El número de muestras fue determinado considerando que la proporción menor de los dos grupos a comparar es 0.70, una potencia de un 95% y una diferencia entre ambas proporciones de 0.15 (Fleiss, 1973). De esta manera, el tamaño muestral mínimo fue de al menos 212 sueros positivos y negativos por la técnica tradicional (ID).

B.-Antígeno:

Se utilizó el antígeno LPS-r soluble de *B. ovis* cepa REO (extracción salina caliente) preparado en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile según normas del Centro Panamericano de Zoonosis (Sánchez, 2005*).

C.-Inmunodifusión Doble en gel de Agar: Se realizó de acuerdo a la técnica de rutina del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (Nota Técnica N°20 OPS/OMS, 1976). Sobre portaobjetos de 76 x 26 mm previamente barnizados con agar al 2%, se aplicaron 3ml. de agarosa (Merck®) para electroforesis al 1% en Solución Tope Salina pH 7.2 (Anexo 1). Una vez solidificada la agarosa, se imprimieron perforaciones; para ello, se utilizó un sistema de perforación en roseta, imprimiendo tres en cada portaobjeto (Fig. 1). Luego se realizó el llenado, dejando el pocillo central para el antígeno y los periféricos para los sueros problema, considerando siempre un pocillo para el suero control. Una vez cargadas las rosetas, se incubó el portaobjeto a temperatura ambiente en cámara húmeda. La lectura se realizó a las 24, 48 y 72 horas.

Todos lo sueros que presentaron bandas de precipitación fueron luego sometidos a prueba de identidad (Steward y Male, 1998) (Fig.2).

* Comunicación Personal Dra. María Luisa Sánchez, Laboratorio de Microbiología Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

Fig.1. Distribución de las perforaciones en roseta en el gel de agar.

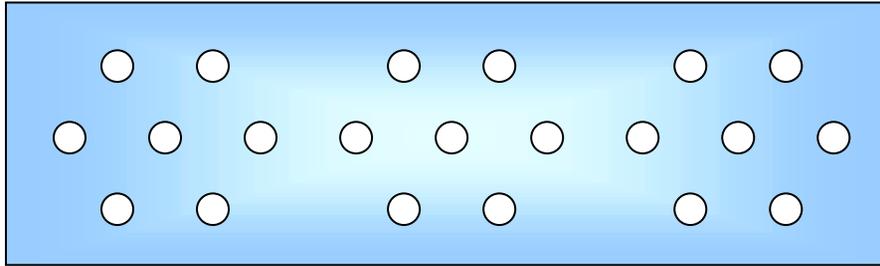
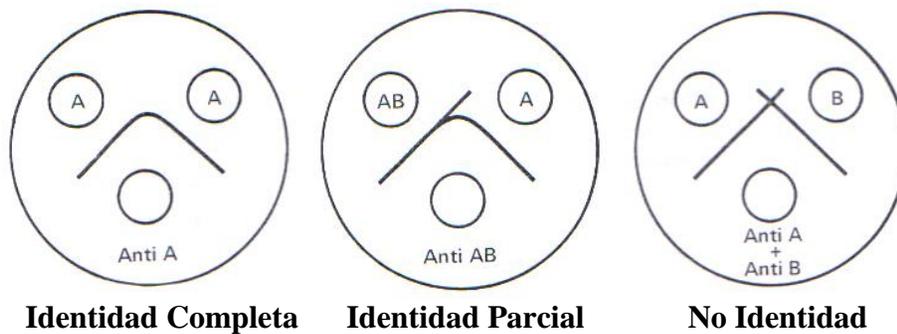


Fig. 2. Reacciones de Identidad, Identidad Parcial y No Identidad.



D.- Contraelectroforesis: Se realizó según la técnica descrita por Myers y Varela-Díaz (1979) con algunas modificaciones. Sobre portaobjetos de 76 x 26 mm, previamente barnizados con agar al 2%, se aplicaron 3 ml. de agarosa (Merck®) para electroforesis al 0.9% en Buffer Barbital pH 8.2 (Anexo 2) sobre un nivel para lograr un grosor uniforme, y se dejaron solidificar durante 30 minutos en placas Petri húmedas a temperatura de refrigeración.

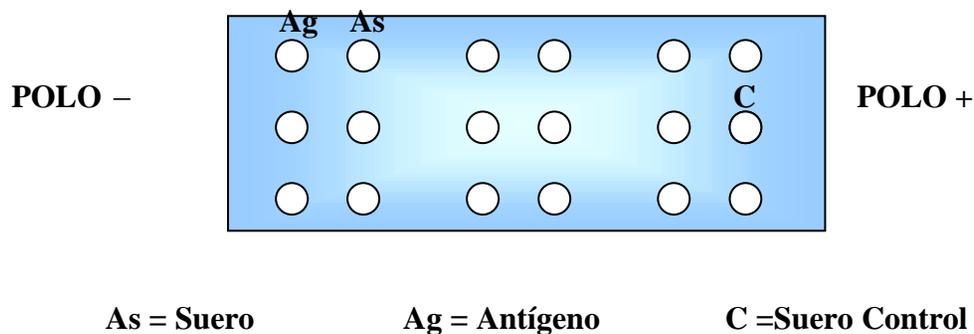
Las perforaciones se realizaron en tres columnas, cada una de ellas con tres pares horizontales de perforaciones paralelas de 3 mm. de diámetro cada una, con una equidistancia de 2 mm. dentro de cada par (Fig. 3).

En cada columna se depositaron los sueros (As) en las perforaciones del lado anódico (+). En cada soporte se utilizó una perforación para el suero control (C). Hecho el

contacto con el buffer cubeta (Anexo 1) mediante papel filtro, se sometió a una corriente eléctrica máxima de 250 V y 7.5 mA por portaobjeto durante 45 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se llenaron los pocillos del lado catódico (-) con el antígeno (Ag) para luego dejar “correr” el portaobjeto durante 2 horas más con el mismo voltaje y amperaje.

Se realizó una primera lectura a las 2 horas, dejando los portaobjetos a temperatura ambiente por 24 horas más. Previo a la lectura final, los portaobjetos se sumergieron en solución citrato monosódico al 5% por 30 minutos para eliminar bandas provenientes de reacciones inespecíficas.

Fig. 3. *Distribución de pocillos en técnica de CIEF.*



D.1.- Titulación del antígeno y antisuero: Para lograr la mejor posición y nitidez de la banda de precipitación entre Ag y As control, se realizaron diluciones del antígeno con Solución Salina Tope al 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/35, 1/40 y 1/45, las que se enfrentaron al suero control diluido de la misma forma, de manera de obtener todas las combinaciones posibles dentro del rango de dilución.

Se seleccionó la combinación Antígeno-Antisuero de máxima dilución que entregó la línea de precipitación más nítida y central.

E.- Análisis Estadístico: Se determinó la sensibilidad, especificidad y concordancia Kappa de la prueba de CIEF frente a la ID. Para determinar diferencias estadísticamente significativas, se realizó la prueba de Mc Nemar para muestras asociadas (Fleiss, 1973).

II. EXPERIENCIA N°2: “*Tiempo de detección de anticuerpos por ID y CIEF en ovinos experimentalmente infectados*”.

F.-Sueros ovinos:

Se contó con 106 muestras seriadas de sueros de 2 carneros infectados experimentalmente en Marzo del 2005 (53 muestras de cada uno) con *B. ovis* por vía prepuccial y conjuntival. Los carneros se denominaron A y B; el primero correspondió a un animal infectado con una cepa obtenida desde un predio en Til-Til (Región Metropolitana), mientras que el segundo correspondió a un animal infectado con una cepa standard N° 63290, importada desde Estados Unidos. Las muestras fueron obtenidas semanalmente desde el día 0 a la semana 58 post inoculación y fueron donadas gentilmente por la Dra. María Luisa Sánchez, Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. El suero control correspondió al mismo utilizado en la Experiencia N°1 (Punto A1).

G.-Antígeno:

Se utilizó el mismo antígeno señalado en la Experiencia 1 (Punto B).

H.-Inmunodifusión Doble en gel de Agar:

La técnica de ID se llevó a cabo según lo señalado en la Experiencia 1 (Punto C).

I.-Contrainmunolectroforesis:

La técnica se realizó de acuerdo a lo indicado en la Experiencia 1 (Punto D).

RESULTADOS

I. EXPERIENCIA N°1: *“Implementación de CIEF y análisis comparativo con ID”*.

Para la implementación de la técnica de CIEF se utilizó el gel de agarosa al 0.9% con un pH 8.2, según lo indicado por la literatura (Myers y Varela-Díaz, 1979). Con esto se logró una línea de precipitación bien definida, sin embargo, se observó que la migración no era la esperada ya que la línea de precipitación se encontraba muy cerca del pocillo del antisuero. Para solucionar este último inconveniente, se decidió “correr” los antisueros en la cámara de electroforesis por 45 minutos previo a ser enfrentados al antígeno, ya que se observó que la banda de precipitación no se centraba al diluir el antígeno.

Una vez obtenida la línea deseada en cuanto a posición y nitidez, se procedió a la titulación del antígeno y el antisuero. La dilución escogida fue de 1/40 para el antígeno, enfrentado al antisuero control sin diluir.

Una vez implementada la técnica, se procedió al análisis de los sueros problema. De los 243 sueros positivos por ID, 176 (72.42%) fueron positivos por CIEF en la lectura temprana (2 horas de corrida electroforética) (Gráfico 1), mientras que de los 243 sueros negativos por ID, la CIEF fue capaz de detectar como positivos sólo 29 de ellos (11.93%) en la lectura temprana (Gráfico 2).

Al realizar la lectura final de la CIEF a las 24 horas se detectaron 25 sueros positivos adicionales a los 176 de la lectura temprana, obteniendo un total de 201 sueros positivos (82.71%) (Gráfico 1); los 42 restantes (17.28%), permanecieron negativos a esta prueba. En el caso de los sueros negativos por ID, la lectura de CIEF a las 24 horas aumentó de 29 (11.93%) a 55 (22.63%) los sueros detectados como positivos (Gráfico 2).

Debido al aumento en la sensibilidad encontrada al realizar la lectura a las 24 horas, se decidió ocupar este tiempo para el diagnóstico de Epididimitis Contagiosa del Carnero mediante CIEF. La distribución de estos resultados respecto a los obtenidos por ID se detallan en la Tabla 2.

Gráfico 1. *Sueros positivos a B. ovis mediante ID analizados por CIEF.*

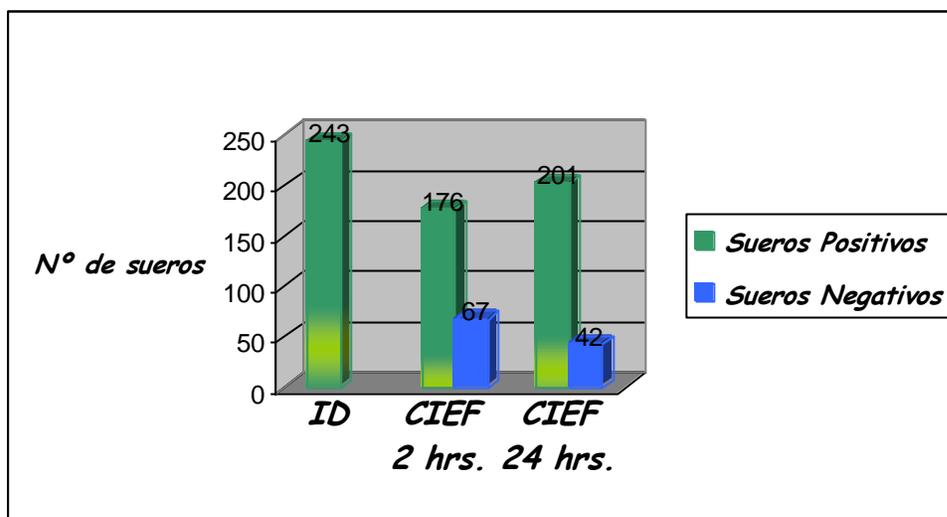
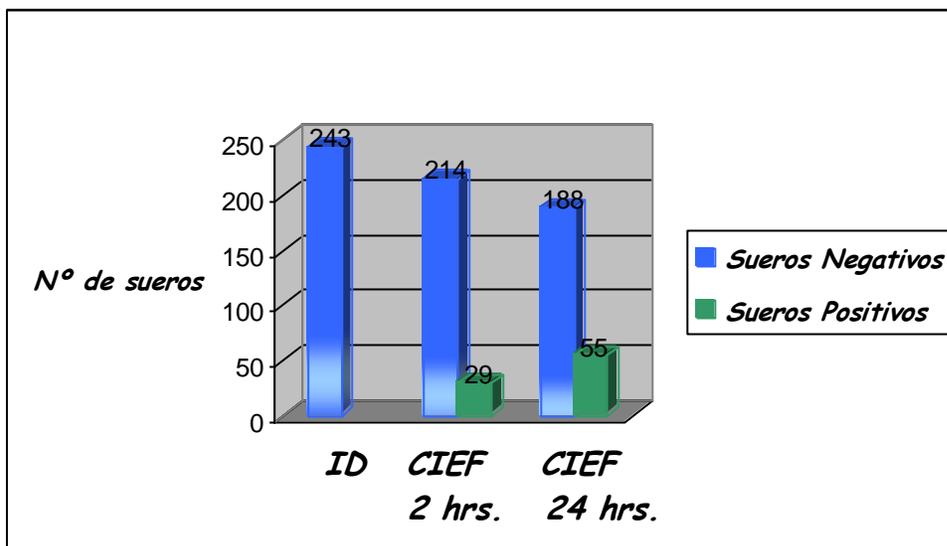


Gráfico 2. *Sueros negativos a B. ovis mediante ID analizados por CIEF.*



Los resultados ilustrados en la Tabla 2 y sometidos a la prueba de Mc Nemar para muestras asociadas, indicaron que no existen diferencias estadísticamente significativas entre la utilización de ID y CIEF para el diagnóstico de Epididimitis del Carnero por *B. ovis* al realizar la lectura a las 24 horas. El índice de concordancia Kappa fue de 0.6, lo que refleja una fuerza de ajuste moderada (Tabla 3).

Tabla 2. Muestras seropositivas y seronegativas a *Brucelosis ovina* (*B. ovis*) según ID y CIEF con antígeno LPS-r.

		ID		
		Positivos	Negativos	TOTAL
CIEF*	Positivos	201	55	256
	Negativos	42	188	230
	TOTAL	243	243	486

**Lectura a las 24 hrs.*

Sensibilidad CIEF: 82.71% (201/243)
Especificidad CIEF: 77.36% (188/243)
X²: p > 0.05
Concordancia (Índice Kappa): 0.6

Tabla 3. *Índice Kappa y Fuerza de Ajuste (Landis y Koch, 1977).*

<i>Kappa</i>	<i>Fuerza de Ajuste</i>
<0	Pobre
0 – 0.20	Ligera
0.21 – 0.40	Adecuado
0.41 – 0.60	Moderado
0.61 – 0.80	Sustancial
0.81 – 1	Casi Perfecto

II. EXPERIENCIA N°2: “Tiempo de detección de anticuerpos por ID y CIEF en ovinos experimentalmente infectados”.

En el carnero A, las pruebas de ID y CIEF detectaron bandas de precipitación a partir de la cuarta semana post-inoculación hasta la semana 58 post-inoculación, que fue la última muestra analizada. La seropositividad no se mantuvo constante a lo largo del tiempo, encontrándose periodos de negatividad en el lapso de tiempo analizado (Anexo 3). Si bien se encontraron similitudes en algunos de estos períodos de negatividad, no fueron exactamente los mismos para ambas pruebas.

En el caso del carnero B, la prueba de ID detectó positividad a partir de la tercera semana post-inoculación y hasta la semana 55 de este estudio y, al igual que en el carnero A, se encontraron periodos de negatividad intercalados con periodos de positividad (Anexo 3). La CIEF detectó complejos inmunes a partir de la cuarta semana post-inoculación y hasta la semana 58. Al igual que lo descrito anteriormente, presentó periodos de positividad intercalados con periodos de negatividad (Anexo 3) que no fueron exactamente los mismos para ambas pruebas.

DISCUSION:

Las políticas económicas que ha tenido Chile en el último tiempo, han traído como consecuencia la firma de distintos tratados de libre comercio, como son los acuerdos firmados con Estados Unidos o la Unión Europea, por citar dos ejemplos. Esto ha abierto nuevos mercados para situar productos agropecuarios en otros países con barreras arancelarias bastante menores que las acostumbradas. Dentro de estos productos se encuentra la carne ovina, la que es considerada en algunos países como un “*delicatessen*”. De esta manera, se hace imprescindible para los planteles de explotación ovina el optimizar los parámetros reproductivos de manera de mantener un buen nivel de producción. Así, cobra vital importancia el diagnóstico de brucelosis ovina por *B. ovis*, hecho que motivó el presente trabajo.

La implementación de la técnica de CIEF para el diagnóstico de Epididimitis Contagiosa del Carnero, si bien siguió lo descrito en la literatura por Myers y Varela-Díaz (1979), sufrió pequeñas modificaciones.

Se determinó para el antígeno una dilución de 1/40 la cual permitió la observación de una línea nítida cuando se enfrentó al antisuero control sin diluir. Sin embargo, la línea obtenida se ubicó muy cercana al pocillo del antisuero, por lo que se tomó la decisión de hacer “correr” el antisuero por 45 minutos en la cámara electroforética previo a que se agregara el antígeno diluido, de manera de centralizar la línea de precipitación. Lo anterior significó un aumento de 15 minutos a lo descrito por Myers y Varela-Díaz (1979). El hecho de colocar el antisuero en la cámara electroforética previo a la incorporación del antígeno tuvo por objetivo darle un mayor tiempo a los anticuerpos para que migraran hacia el

pocillo del antígeno, de manera tal que se desplazara la banda de precipitación hacia el pocillo del antígeno, permitiendo centrar la línea.

El antisuero control produjo reacciones de precipitación nítidas y centrales solamente cuando fue utilizado sin diluir. Este hecho ha sido descrito en la literatura, ya que la línea de precipitación está formada por una mayor proporción de anticuerpos en comparación con el antígeno, se necesitan antisueros con altos títulos de anticuerpos para obtener una línea clara, pero sólo una pequeña cantidad de antígeno es necesaria (Anhalt, 1978). Esto, si bien no implica un gran aumento en cuanto a costos, significa que el suero control se gastará más rápido que si fuera utilizado en forma diluida debiendo obtenerlo nuevamente por infección experimental de un carnero con los costos asociados a mano de obra, alimentos, materiales y tiempo. Hasta la fecha, según la bibliografía revisada, no existe la posibilidad de adquirir antisueros comerciales en Chile.

En relación al tiempo de lectura de la CIEF, aunque en un principio se planteó realizarla a las 2.5 horas, que es lo que demora la CIEF para *B. ovis* según Myers y Varela-Díaz (1979), se observó que existían mejores resultados si la muestra era leída luego de 24 horas de permanencia a temperatura ambiente. Esta situación permitió que la sensibilidad aumentara en 10.29 puntos porcentuales (72.42% a las 2 horas v/s 82.71% a las 24 horas). Aunque no era lo que se esperaba lograr en un principio, sigue siendo una reducción de tiempo considerable. El aumento en la sensibilidad no es difícil de suponer si se considera que durante las 24 horas que los geles estuvieron en reposo previo a su lectura se produce una difusión pasiva de antígenos y anticuerpos a través de la placa lo que produjo que algunos sueros reportados como negativos a las 2 horas fueran interpretados como positivos a las 24 horas. No se intentó aumentar el tiempo de corrida electroforética debido a que

produce calentamiento de las placas, con la consecuente alteración del gel de agarosa, problema que quizás podría evitarse si se contara con un sistema de enfriamiento.

En cuanto a la sensibilidad de las pruebas comparadas, la menor sensibilidad y especificidad que resultó tener la prueba de CIEF puede deberse a que se ocupó como prueba “Gold Standard” la ID, otorgándosele a ésta un 100% de sensibilidad y especificidad (En la literatura estos valores varían levemente, pudiendo encontrar sensibilidades cercanas al 90%) . Pese a lo anterior, los resultados obtenidos por ambas pruebas no fueron significativamente distintos y presentaron una concordancia de 0.6, lo que corresponde a un ajuste moderado (Tabla 3). Cabe destacar que la prueba de ID se realizó con agar de pH 7.2, aunque actualmente la recomendación de la OIE es realizar la prueba con agar en buffer borato de pH 8.3 (OIE, 2004). Esto último podría afectar la sensibilidad y especificidad de la ID.

La utilización de la ID como “Gold Standard” en lugar de el cultivo se debe a que en la práctica, las pruebas utilizadas para el diagnóstico de brucelosis ovina por *B. ovis* corresponden a pruebas serológicas, debido a su rapidez, alta sensibilidad y especificidad, facilidad de realización y capacidad de analizar un gran número de muestras a la vez; ventajas que el cultivo no presenta, fundamentalmente por la intermitencia en la excreción de *B. ovis* en semen, dificultad de tomar este tipo de muestra en un gran número de animales en forma rápida, tiempo y condiciones que necesita la bacteria para desarrollarse en medios de cultivo.

Si bien en la bibliografía se han descrito sensibilidades de 100% de la CIEF frente a la ID para *B. ovis* (Myers y Varela-Díaz, 1979) y *B. canis* (Lasserre, 1984), esto difiere con lo observado en este estudio (82.71%). Esto puede deberse a que el tamaño muestral del

presente trabajo (486 sueros) fue considerablemente mayor al anteriormente descrito para *B. ovis* por Myers y Varela-Díaz (181 sueros).

El análisis de los resultados de ambos carneros infectados experimentalmente demostró que ambos métodos, utilizando LPS-r de *B. ovis*, fueron capaces de detectar tempranamente la infección por *B. ovis* (promedio 26 días post-inoculación). La seropositividad, a pesar que no fue permanente en el tiempo, se detectó hasta la semana 58 post-inoculación en el caso de la CIEF para ambos carneros y hasta la semana 58 y 55 post-inoculación para la ID (carnero A y B respectivamente). En ambas pruebas la detección de complejos antígeno-anticuerpo no fue constante, existiendo periodos de negatividad intercalados con periodos de positividad. Esta conducta ya ha sido reportada en otras enfermedades de curso crónico, como es el caso de brucelosis canina por *B. canis*, en que se describe que cuando desaparece la bacteriemia, disminuyen los títulos de aglutinación (Carmichael y Greene, 2000).

A título complementario, se analizaron 99 sueros sospechosos por la prueba de ID (datos no mostrados). El análisis arrojó que la CIEF detectó 27 sueros con banda de precipitación, obteniéndose en los 72 sueros restantes resultados negativos o con líneas poco nítidas. Las muestras con reacciones poco nítidas se informan como sospechosas. En el caso de la ID, los resultados inespecíficos se resuelven mediante las pruebas de identidad, que permiten observar si la banda de precipitación obtenida corresponde a identidad parcial, total o no identidad. Sin embargo, presenta el inconveniente que muchas veces la unión esperada de ambas bandas es muy sutil, lo que podría complicar su interpretación.

Finalmente, es interesante señalar que, pese a los buenos resultados que ha mostrado la CIEF en la literatura y en el presente estudio, llama la atención que no ha sido utilizada

rutinariamente para el diagnóstico de brucelosis ovina por *B. ovis* a nivel internacional. Esto expone la interrogante de que quizás sea necesario realizar mayores estudios de esta técnica, probablemente utilizando animales infectados experimentalmente y/o infectados de campo con cultivo como “Gold Standard”, de tal manera de poder determinar la sensibilidad real de la prueba de CIEF. Pese a lo anterior, los resultados obtenidos en este estudio permiten decir que la prueba de CIEF con LPS-r de *B. ovis* es un método fácil de realizar, económico, y de buena sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la Epididimitis del Carnero por *B. ovis*.

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos, se puede concluir que:

- 1.- Se logra implementar la técnica de CIEF con lectura a las 24 horas utilizando antígeno LPS-r de *B. ovis* para el diagnóstico de Epididimitis Contagiosa del Carnero.
- 2.- La técnica de CIEF implementada no mostró diferencias estadísticamente significativas al ser comparada con la ID, obteniendo sensibilidad y especificidad mayor a 75%.
- 3.- Las pruebas de CIEF e ID realizadas con antígeno LPS-r mostraron un grado de concordancia moderado mediante índice Kappa.
- 4.- Las pruebas de CIEF e ID logran detectar tempranamente anticuerpos contra LPS-r de *B. ovis* en carneros infectados experimentalmente con cepa nativa (Til-Til) y una cepa estándar (N° 63290).

BIBLIOGRAFÍA

- **ANHALT, J.; KENNY, G.; RYTEL, M.** 1978. Detection of microbial antigens by counterimmunoelectrophoresis. **In:** Cumulative Techniques and Procedures in Clinical Microbiology 8. Washington D.C., Estados Unidos. Diciembre, 1978.
- **AREVALO, S.** 2004. Determinación de Brucelosis Ovina (*Brucella ovis*), en Predios de la Undécima Región de Chile. Memoria Médico Veterinario. Valdivia, Chile. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias. 26 p.
- **BLASCO, J.M.; GAMAZO, C.** 1994. Brucelosis animal. Investigación y Ciencia 218: 56-62.
- **CARMICHAEL, L.; GREENE, C.** 2000. Brucelosis canina. **In:** Greene, C. Enfermedades Infecciosas en Perros y Gatos. Segunda Edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. México D.F., México. pp. 274-285.
- **CHIN, J.C.; PANG-TURNER, B.** 1990. Profiles of serological reactivity against cytosoluble antigens of *Brucella ovis* in experimentally infected rams. J. Clin. Microbiol. 28(12): 2647-2652.
- **CORBEL, M.J.** 1997. Brucellosis: an overview. Emerg. Infect. Dis. 3(2): 213-221.
- **DURAN-FERRER, M.; LEON, L.; NIELSEN, K.; CAPORALE, V.; MENDOZA, J.; OSUNA, A.; PERALES, A.; SMITH, P.; DE-FRUTOS, C.; GOMEZ-MARTIN, B.; LUCAS, A.; CHICO, R.; DELGADO, O.D.; ESCABIAS, J.C.; ARROGANTE, L.; DIAZ-PARRA, R.; GARRIDO, F.** 2004. Antibody response and antigen-specific gamma-interferon profiles of vaccinated and unvaccinated pregnant sheep experimentally infected with *Brucella melitensis*. Vet. Mic. 100: 219-231.
- **DUVAUCHELLE, E.** 1994. Evaluación de una prueba de ELISA indirecto para el diagnóstico de Brucelosis ovina. Memoria Médico Veterinario. Valdivia, Chile. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias. 27 p.
- **ESTEIN, S.M.** 1999. Aspectos inmunológicos y control de la epididimitis del carnero por *Brucella ovis*. Arch. Med.Vet. 31(1): 5-17.

- **FICAPAL, A.; JORDANA, J.; BLASCO J.M.; MORIYON, I.** 1998. Diagnosis and epidemiology of *Brucella ovis* infection in rams. *Small Rumin. Res.* 29: 13-19.
- **FLEISS, J.** 1973. *Statistical methods of rates and proportions.* Wiley Interscience. Nueva York, Estados Unidos. pp. 79-80, 146.
- **GOLDBAUM, F.; LEONI, J.; WALLACH, J.; FOSSATI, C.** 1993. Characterization of an 18-Kilodalton *Brucella* cytoplasmatic protein which appears to be a serological marker of active infection of both human and bovine brucellosis. *J. Clin. Microbiol.* 31(8): 2141-2145.
- **JIMENEZ DE BAGÜÉS, M.P.; ELZER, P.H.; BLASCO, J.M.; MARIN, C.M.; GAMAZO, C.; WINTER, A.J.** 1994a. Protective immunity to *Brucella ovis* in BALB/c mice following recovery from primary infection or immunization with subcellular vaccines. *Infect. Immun.* 62(2): 632-638.
- **JIMENEZ DE BAGÜÉS, M.P.; ELZER, P.H.; JONES, S.M.; BLASCO J.M.; ENRIGHT F.M.; SCHURIG, G.G.; WINTER A.J.** 1994b. Vaccination with *Brucella abortus* rough mutant RB51 protects BALB/c mice against virulent strains of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, and *Brucella ovis*. *Infect. Immun.* 62(11): 4990-4996.
- **KIMBERLING, C.** 1988. *Diseases of Rams.* In: Jensen and Swift`s *Diseases of Sheep.* Tercera Edición. Lea and Febiger. Philadelphia, Estados Unidos. 377 p.
- **LANDIS, J. R.; KOCH, G.G.** 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33: 159-174.
- **LASSERRE, M.** 1984. *Brucelosis canina: Diagnóstico comparativo entre doble difusión en agar y contrainmunolectroforesis.* Tesis Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 38p.
- **LOPÉZ, 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(3-4): 181-187.

- **MANTEROLA, L.; TEJERO-GARCES, A.; FICAPAL, A.; SHOPAYEVA, G., BLASCO, J.M.; MARIN, C.M.; LOPEZ-GOÑI, I.** 2003. Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in semen samples from rams. *Vet. Microbiol.* 92(1-2): 65-72.
- **MARÍN, C.M.; ALABART, J.L.; BLASCO, J.M.** 1996. Effect of antibiotics contained in two *Brucella* selective media on growth of *Brucella abortus*, *B. melitensis*, and *B. ovis*. *J. Clin. Microbiol.* 34(2): 426-428.
- **MATAMALA, L.** 2006. Estudio descriptivo de diagnósticos realizados en el Laboratorio de Microbiología Clínica Veterinaria de la Universidad de Chile. Periodo 1995 a 2002. Memoria Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 60p.
- **MYERS, D.; VARELA-DIAZ, V.** 1979. Serodiagnosis of ram epididymitis by counterimmunoelectrophoresis, using *Brucella ovis* surface R antigen. *J. Clin. Microbiol.* 10(4): 451-453.
- **NIELSEN, K.** 2002. Diagnosis of Brucellosis by serology. *Vet. Microbiol.* 90: 447-459.
- **OCHOLI, RA.; KWAGA, J.K.; AJOGI, I.; BALE, J.O.** 2005. Abortion due to *Brucella abortus* in sheep in Nigeria. (Abstract). *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 24(3): 973-979.
- **OFICINA INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS.** 2004. Ovine Epididymitis (*Brucella ovis*). **In:** Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals. Quinta Edición. [en línea]. <http://www.oie.int/fr/normes/mmanual/A_00068.htm>. [consulta: 15-10-2006].
- **ORELLANA, M.** 1982. Brucelosis ovina: Modificaciones de algunas características del semen del carnero, producidas por la infección experimental con *Brucella ovis*. Tesis Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, Veterinarias y Forestales. 49p.
- **ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD.** 1976. Brucelosis. Técnica de Difusión e Agar para el diagnóstico de la epididimitis de los carneros. Nota Técnica N°20.

- **RIEZU-BOJ, J.I.; MORIYON, I; BLASCO, J.M.; MARÍN, C.M.; DÍAZ, R.** 1986. Comparison of Lipopolysaccharide and outer membrane protein-lipopolysaccharide extracts in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella ovis* infection. *J. Clin. Microbiol.* 23(5): 938-942.
- **RIEZU-BOJ, J.I.; MORIYON, I; BLASCO, J.M.; GAMAZO, C.; DÍAZ, R.** 1990. Antibody response to *Brucella ovis* outer membrane proteins in ovine Brucellosis. *Infect. Immun.* 58(2): 489-494.
- **SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO. DIVISIÓN DE PROTECCIÓN PECUARIA.** 2006a. Situación sanitaria de Chile, 2005 Información enviada a la OIE. [en línea]. <http://www.sag.gob.cl/pls/portal/docs/PAGE/PG_SAG_BIBLIOTECA/BIBL_SANIDAD/BIBLI_SANANIMAL/BIBLIO_SANANI_INFORMES/SITUACION_SANITARIA_CHILE_2005.PDF>. [consulta: 20-10-2006].
- **SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO.** 2006b. Manual del Ganadero. [en línea]. <http://magallanes.sag.gob.cl/man_gan.htm#brucella>. [consulta: 23-10-2006].
- **SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO.** 2006c. Listado de Medicamentos Veterinarios Registrados por Especies. [en línea]. <http://www.sag.gob.cl/portal/page?_pageid=133,904936&_dad=portal&_schema=PORTAL>. [consulta: 11-12-2006].
- **STEWART, M.; MALE, D.** 1998. Immunological Techniques. **In:** Roitt, I.; Brostoff, J; Male, D. Immunology. Cuarta Edición. Editorial Mosby. Barcelona, España. pp. 28.1-28.15.
- **TIZARD, I;** 1995. Serología: Detección de anticuerpos y métodos de medida. **In:** Inmunología Veterinaria. Cuarta Edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. Ciudad de México, México. pp. 241-266.
- **VIGLIOCCO, A.; SILVA, P.; MESTRE, J.; BRIONES, G.; DRAGHI, G.; TOSSI, M.; NIELSEN, K.** 1997. Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of ovine antibody to *Brucella ovis*. *Vet. Microbiol.* 54: 357-368.

ANEXO 1

1.- Solución Salina Tope:

- Solución Fisiológica 0.85%	92 ml.
- Solución Tope Soerensen	8 ml.

2.- Solución Tope Soerensen:

-Na ₂ HPO ₄ anhidro	8 gr.
-KH ₂ PO ₄ anhidro	1.1 gr.
-Agua Destilada c.s.p.	1000 ml.
pH 7.2-7.3	

3.- Buffer Cubeta: Solución buffer stock barbital diluido 1:2 en agua destilada.

4.- Buffer Stock Barbital HCl 0.1 M:

-Barbital Sódico	26.6 gr.
- Agua Destilada	700 ml.
- HCl 0.1M	129 ml.
pH 8.2	
-Agua Destilada c.s.p.	1000 ml.

ANEXO 2

Tabla 4. Sueros Positivos por ID analizados por CIEF*.

SUERO N°	ID	CIEF 2 HRS.	CIEF 24 HRS.
9	++	-	++
10	++	-	-
15	++	-	++
16	++	-	+
17	++	-	++
18	++	-	++
23	++	-	++
25	++	++	-
26	++	-	++
45	++	-	++
47	++	-	-
62	++	++	-
63	++	-	-
67	++	-	-
68	++	-	++
75	++	-	++
78	++	-	-
79	++	-	-
80	++	-	++
81	++	-	-
85	++	-	-
86	++	++	-
92	++	++	-
99	++	-	-
102	++	-	++
110	++	-	++
111	++	-	++
115	++	-	-
116	++	-	++
117	++	-	++
118	++	-	-
119	++	-	++
120	++	-	++
121	++	-	++
122	++	-	-
123	++	-	-
124	++	-	-

* Sólo se incluyen los sueros que mostraron diferencias en sus resultados.

125	++	-	-
126	++	-	-
131	++	-	-
132	++	-	-
133	++	-	++
138	++	-	++
146	++	-	++
147	++	-	++
148	++	-	++
151	++	-	++
154	++	-	++
155	++	-	++
156	++	-	-
163	++	-	-
170	++	-	-
171	++	-	++
172	++	-	-
175	++	-	++
179	++	-	-
187	++	++	-
191	++	-	++
192	++	-	++
196	++	++	-
197	++	-	-
198	++	-	++
199	++	-	-
200	++	-	++
205	++	++	-
213	++	-	-
214	++	++	-
215	++	++	-
216	++	++	-
220	++	++	-
221	++	-	-
222	++	-	-
226	++	-	++
227	++	-	-
228	++	++	-
234	++	++	++
235	++	-	-
241	++	-	++
242	++	-	++
243	++	-	++

++ = **Positivo**
- = **Negativo**

Tabla 5. Sueros Negativos por ID analizados por CIEF*

SUERO N°	ID	CIEF 2 HRS.	CIEF 24 HRS.
1	-	++	-
2	-	++	-
3	-	++	-
4	-	++	++
5	-	++	++
6	-	++	++
7	-	++	++
13	-	-	++
14	-	-	++
15	-	++	++
20	-	++	++
21	-	++	++
22	-	++	++
24	-	++	++
25	-	++	-
26	-	++	++
30	-	-	++
31	-	-	++
32	-	-	++
36	-	++	-
56	-	-	++
57	-	-	++
58	-	-	++
62	-	-	++
63	-	-	++
64	-	-	++
77	-	++	-
93	-	++	-
131	-	-	++
138	-	-	++
139	-	-	++
140	-	-	++
146	-	++	++
147	-	-	++
148	-	-	++
149	-	-	++
154	-	++	++
155	-	-	++
157	-	-	++
158	-	-	++
173	-	-	++

* Sólo se incluyen los sueros que mostraron diferencias en sus resultados.

179	-	-	++
180	-	-	++
186	-	-	++
194	-	++	-
195	-	++	++
196	-	++	++
198	-	++	++
202	-	++	++
203	-	++	++
204	-	++	++
205	-	-	++
210	-	-	++
211	-	-	++
212	-	++	++
214	-	-	++
221	-	-	++
226	-	-	++
228	-	-	++
230	-	-	++
237	-	-	++
242	-	++	++
243	-	++	++

++ = **Positivo**
- = **Negativo**

ANEXO 3

TIEMPO DE DETECCIÓN DE ANTICUERPOS POR ID Y CIEF EN OVINOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS

SEMANA	CARNERO A		CARNERO B	
	<i>ID</i>	<i>CIEF</i>	<i>ID</i>	<i>CIEF</i>
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	++	-
4	++	++	++	++
5	++	++	++	++
6	++	++	++	++
7	++	++	-	++
8	++	++	-	++
9	++	++	-	++
10	-	-	-	-
11	++	-	++	-
12	-	++	-	-
13	-	++	-	++
14	++	++	-	-
15	++	++	++	-
16	++	-	++	-
17	++	-	++	++
18	++	-	++	-
19	++	-	++	-
20	++	++	++	++
21	++	++	++	++
22	++	++	++	++
23	++	++	-	-
24	++	-	++	++
25	++	-	++	++
26	++	++	++	++
27	++	++	++	-
28	++	++	-	++
29	-	++	++	++
30	++	++	-	++
31	++	++	++	-
32	++	++	++	++
33	++	++	++	-
34	++	-	++	++
35	++	-	-	-
36	++	++	-	++
37	++	++	-	++

38	++	++	-	++
39	-	++	-	++
40	-	++	-	-
41	-	++	-	-
42	++	++	++	-
43	++	++	++	-
44	++	++	++	++
45	++	++	++	++
46	++	++	++	++
48	++	-	++	++
49	++	-	++	-
50	++	-	++	++
51	++	-	++	++
52	++	-	++	-
55	++	++	++	-
58	++	++	-	++

** Las semanas 47, 53, 54, 56, 57 no hubo muestreo.