

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Instituto de Microbiología
Facultad de Ciencias

**UTILIZACIÓN DE LOS TEST DE FLUORESCENCIA POLARIZADA (FP) Y ELISA
DE COMPETENCIA (C-ELISA) EN EL DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS DE
CAMÉLIDOS Y COMPARACIÓN CON LAS TÉCNICAS RUTINARIAS DE
DIAGNÓSTICO.**

**Memoria de Título presentada como parte
de los requisitos para optar al TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO**

SERGIO ORLANDO MUÑOZ MONSALVE

VALDIVIA-CHILE

2003

PROFESOR PATROCINANTE

Dra. Ximena Rojas

PROFESOR COPATROCINANTE

Dra. Benigna Pérez

PROFESOR. COLABORADOR

Dra. Bárbara Otto

PROFESORES CALIFICADORES

Dr Jorge Correa

Dra Stella Riedemann

FECHA DE APROBACIÓN: 6 de Marzo del 2003

A mi familia, en especial a mi padre y a mi esposa por su gran paciencia y comprensión..

INDICE

CONTENIDO	PÁGINA
1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. MATERIAL Y MÉTODOS	9
5. RESULTADOS	18
6. DISCUSIÓN	22
7. BIBLIOGRAFÍA	25
8. ANEXOS	28

1. RESUMEN

Utilización de los test de Fluorescencia Polarizada (FP) y Elisa de Competencia (C-Elisa) en el diagnóstico de brucelosis de camélidos y comparación con las pruebas rutinarias de diagnóstico.

En Chile, como en muchos países de Latinoamérica, la brucelosis es una zoonosis presente, representando no sólo un factor de riesgo para las explotaciones pecuarias sino también para quienes laboran y hacen usufructo de ella, especialmente por el consumo de leche cruda y sus derivados. Como la *Brucella* afecta a diferentes especies de animales, el objetivo de este trabajo fue utilizar las técnicas de unión primaria, como son Fluorescencia Polarizada (FP) y Elisa de Competencia (C-Elisa), para la detección de anticuerpos anti-*Brucella* en suero de camélidos y, comparar sus respuestas con las pruebas de Rosa de Bengala (RB), Aglutinación Lenta en Tubo (SAT) y Fijación de Complemento (FC) en atención a que estas especies representan un potencial pecuario de cierta trascendencia.

Para ello se analizaron 336 sueros, de los cuales 315 pertenecían a llamas y 21 a alpacas, provenientes de un predio de la Novena Región clínica y serológicamente libre de *Brucella*.

Los resultados obtenidos señalan que el umbral de positividad para FP, calculado según la mediana del último percentil, fue de 98.7 milipolarizaciones (mP) y, el corte para C-Elisa con el mismo método fue de 32% de Inhibición (% I).

Todas las muestras analizadas dieron resultados negativos a RB y SAT. Los resultados con FC no pudieron ser considerados, por cuanto un alto porcentaje de las muestras fueron A/C. Con las técnicas de C-Elisa y FP, dos muestras reaccionaron positivamente en cada uno de los test con valores en el nivel de corte o levemente superiores. Se discute la significación de ellas.

Palabras claves: FP, C-Elisa, llamas, alpacas.

2. SUMMARY

The use of Polarized Fluorescence assay (PF) and Competitive Elisa test (C-Elisa) for Brucella Diagnosis in South American Camelids comparatively with the routine test.

In Chile, like in many other countries, brucellosis is a zoonotic disease representing a risk factor not only for farm animals but also for people in contact with, or consuming, raw milk and raw dairy product. Because *Brucella* organisms can infect several animal species including camelids, the aim of this research was to apply two primary assays, Polarized Fluorescence (PF) and Competitive Elisa (C-Elisa), to detect anti-*Brucella* antibody in camelids sera, along side with other conventional serological tests such as Rose Bengal test, (RB), Seroagglutination test (SAT) and Complement Fixation test (CF).

A total of 336 serum samples obtained from 315 lamas and 21 alpacas from a herd of the IXth Region (Chile), clinically and serologically free of brucellosis was tested.

The results were analyzed considering a threshold of 98.7 milipolarization (mP) for PF and 32% of Inhibition for C-Elisa both of them got by mean of the median of the last percentil

All samples showed negative results to RB and SAT tests. The CF results were not included as many samples gave anticomplementary results. According to the PF and C-Elisa tests, two samples gave positive closely related to the cut-off point and their significance is discussed.

Key words: PF, C-Elisa, lamas, alpacas.

3. INTRODUCCIÓN

"Crió Dios las llamas en estas tierras frías para el bien de los moradores dellas, que sin este ganado pasarán la vida con gran dificultad". Como narra, en castellano antiguo, Bernabé Cobo en 1653 (Raggi, 2001).

Desde hace más de seis mil años los camélidos sudamericanos (CSA) forman parte del ambiente físico y cultural de la Región altiplánica (FAO, 1996).

Junto con los cultivos andinos, constituyen una prueba viviente del notable desarrollo agropecuario alcanzado en la Región andina por antiguas civilizaciones (Fernández-Baca, 1991).

El desarrollo de una economía ganadera andina a raíz de la domesticación de la alpaca y la llama es único en las Américas y comparable con la evolución del pastoreo de caprinos, ovinos y bovinos en el viejo mundo, es así como se constituye en una de las pocas actividades ganaderas que se pueden llevar a cabo en terrenos geográficos ubicados en las grandes alturas, lo que por sí sólo constituye un motivo más que justificado para estudiarlas, independiente del conocimiento requerido por el progresivo desarrollo de esta ganadería en otras regiones de Chile e incluso, de la incursión en diferentes regiones, de cada vez más ejemplares como animales de compañía (Raggi, 2001).

Debido a que en el mundo actual los recursos naturales son cada vez más escasos, es preciso buscar una ganadería que cause el mínimo impacto sobre la naturaleza y más bien, mejorar las condiciones encontradas.

Esto ocurre con el tema de los camélidos domésticos sudamericanos, entre las características que podemos mencionar están; que al pastar no producen erosión, cortan el pasto sin arrancarlo, no necesitan más 1.5 lt de agua al día y son inmensamente resistentes al medio ambiente adverso. Además la alpaca produce fibra de excelente calidad, su carne es rica en proteínas y bajísima en colesterol (0.16%) sumándose a esto su carácter dócil (Hill, 1999).

Los CSA están representados por la vicuña (*Vicugna vicugna*) y el guanaco (*Lama guanicoe*), como especies silvestres y por la llama (*Lama glama*) y alpaca (*Lama pacos*), como especies domésticas (Torres, 1992).

Aparecieron en Norteamérica, aproximadamente 40 a 45 millones de años atrás. Fueron una de las primeras familias de artiodáctilos. Se dispersaron a América del Sur, y posteriormente desaparecieron de Norteamérica hace 10.000 años (Sarno y col; 1998).

En el año 1500 existían probablemente más de un millón de camélidos domésticos, distribuidos en las tierras bajas de Chile desde el valle del río Copiapó hasta la isla de Chiloé.

Un cambio drástico se produjo en el siglo XVI y XVII, en este período desaparecieron por completo en las áreas no montañosas (zonas bajas) y fueron reemplazados por ganado de origen europeo. La razón de su rápida extinción, tal vez de debió a la llegada de parásitos y enfermedades al país y el hecho de que no se extinguieron en el altiplano pudo deberse a que se trataba de enfermedades que por razones ecológicas no prosperaban a esas alturas (Rottmann, 1981).

La llama es el mayor de los CSA, llega a pesar hasta 125 kilos. Es utilizada primariamente como animal de carga y puede transportar materiales y objetos de 25 a 30 kilos, a distancias de 15 a 20 kilómetros por día (Torres, 1992).

Dentro de los camélidos, la vicuña y el guanaco, se consideran los antecesores silvestres de la alpaca y de la llama respectivamente y constituyen un valioso recurso genético que debe ser conservado (Fernández-Baca, 1991).

Respecto de las especies domésticas Torres (1992) estimaba que la población total de llamas y gran parte de la población de alpacas en la cordillera de los Andes eran propiedad de pastores tradicionales, en tanto que la población total de ellas en Sudamérica se estimaba en 6.117.315 animales en 1999 (Chile, 2000).

Los camélidos sudamericanos son individuos adaptados a condiciones ambientales muy adversas y pertenecen al escaso número de especies que toleran el frío y la altura, hecho que los hace muy interesantes debido a que se adaptan fácilmente a diversas condiciones ambientales de nutrición y manejo (Raggi, 2001).

No solo en el norte de Chile se les puede encontrar, ya que en los últimos años se han desarrollado esfuerzos por introducir e impulsar esta ganadería, en particular la de alpacas, en otras regiones del país, como la VI, VII y VIII (Chile, 2000) e incluso en la Región de Magallanes donde ciertas características geoclimáticas no son tan diferentes a las del altiplano. En la mayoría de los casos se han adaptado bastante bien, incluso a zonas húmedas y lluviosas. Existen eso sí algunos problemas sanitarios, especialmente con *Fasciola hepatica* y *Clostridium spp* (Rottmann, 1981).

De acuerdo a los datos recogidos por el VI Censo Agropecuario Nacional de 1997 el número de cabezas de llamas en Chile correspondían a 79.365, estando el 90.1% de ellas en la I Región, en las otras Regiones los porcentajes no superaban el 1% de la participación total, excepto en la II Región, con un 6.85% de animales. A su vez las alpacas son 45.282, encontrándose el 89% en la I Región y según los datos recogidos los camélidos domésticos sudamericanos representan sólo el 1% de la masa total del ganado existente en nuestro país (Chile, 1997).

En Chile, la población está creciendo y se está expandiendo por la transferencia de rebaños, a modo experimental, a otras zonas de crianza, como la zona central y sur del país. Así, los CSA han cumplido y cumplen en la actualidad un rol importante en la economía de un vasto sector de la población que habita los Andes altos siendo, preferencialmente, la llama

fuelle de carne y la alpaca fuente de fibra o mal llamada lana, la cual representa solo el 2.5% del total mundial de exportación de fibras de origen animal. En nuestro país la producción potencial anual de pelo vellón en la I Región no podría ir mas allá de 49 toneladas (27 de llamas y 22 de alpacas). En términos reales, la producción sería aproximadamente 30 toneladas (11 de llamas y 19 de alpacas) (Chile, 2000).

A su vez, sus pieles y cueros se comercializan en forma fresca o salada. El mejor mercado es el de las pieles de crías nonatas de madres que abortan en los últimos meses de gestación y de crías post-natales que mueren por alguna razón. Sin embargo, su valoración es menor a los cueros de otras especies como ovinos y bovinos (Chile, 2000).

En la ciudad de Arica, según lo expresara Pizarro (1998) los camélidos sudamericanos especialmente las llamas representan el principal animal faenado en matadero y según Torres (1992) en la cordillera de los Andes se consumen anualmente varios miles de kilos de carne de llama secada al sol, producto conocido como charqui.

De este modo, el consumo de carne, tanto de alpaca como de llama se encuentra limitado a la I y II Región, donde existen alrededor de 20 mataderos que faenan estas especies y se estimaba que procesaban unos 20.000 animales al año (Bas y González; 1990).

Al analizar únicamente las cifras de los animales beneficiados en los mataderos de Arica, se observa que los camélidos son la especie de mayor significación (60.78%), superando incluso a la suma de bovinos, ovinos y porcinos (Chile, 2000) y su consumo a crecido en un 608% durante los últimos 10 años en esa ciudad (Raggi, 1992).

Con respecto al mercado internacional, desde 1979 se inicia en Chile un interés por exportar estos animales, pero se observa actualmente una disminución en la exportación y un aumento en la cantidad de animales rechazados, lo que plantea que existe una presión internacional por animales de mucha mayor selección y un fenotipo de mejor calidad. A su vez Estados Unidos cerró en 1998 los registros genealógicos para alpacas y llamas, con esto obliga que los precios que mantiene estén estabilizados dentro de cifras altas (Raggi, 1998).

Como se aprecia, los camélidos tienen importancia desde el punto de vista de la producción tanto de cueros, lana, carne y otros para surtir las necesidades de pequeños productores de la árida zona norte de Chile. Indudablemente si se quiere mantener o mejorar la explotación de estos animales, su manejo incluido el sanitario, debe ser óptimo y riguroso. Ello implica estudiar la población determinando que agentes infecciosos le afectan.

La ocurrencia de enfermedades en ellos tiene trascendental importancia tanto para las especies domésticas, alpaca y llama, como para las especies silvestres, vicuña y guanaco. En el primer grupo, su negativa repercusión en la producción se traduce en impacto socioeconómico para el criador y para la economía nacional, como resultado de su efecto en la comercialización y exportación de sus productos (Fernández-Baca, 1991).

Anteriormente se señaló la comercialización de pieles de crías abortadas, en consecuencia el síndrome abortivo ha sido visualizado. Si bien es cierto las causas de aborto, como en toda especie animal, pueden ser variadas, es posible asumir una cierta participación de organismos del género *Brucella*. Para los camélidos se estimó que era el ganado ovino la fuente de infección. Al respecto, los antecedentes son escasos y se sabe que son susceptibles a *Brucella melitensis* tipo I (Murray, 1998).

Especialmente las alpacas parecen ser muy susceptibles a este biotipo y pueden desarrollar anticuerpos detectables a la prueba de aglutinación en placa (Fernández-Baca, 1991). Considerando que la enfermedad puede ser transmitida al hombre, especialmente por consumo de leche cruda y derivados, la presencia de *Brucella* no solo representa un factor de riesgo para la explotación pecuaria sino también para quienes laboran o hacen usufructo de ella.

La transmisión en los camélidos infectados con cepas lisas se asumió que es la misma que en el ganado ovino y de cabras, en los cuales la ruta más usual es la ingestión de alimento y de agua que ha sido contaminada con excreciones corporales, o por contacto directo entre individuos. La placenta y los fluidos fetales de animales infectados son fuente importante de estos organismos, los cuales también son encontrados en la leche (Murray, 1998). En una epidemia detectada en un rebaño de alpacas en el Perú se describieron los signos clásicos de brucelosis. Una vez infectados, los títulos séricos pueden ser detectados por los métodos usuales de diagnóstico para detección de *Brucella* lisa.

Así por ejemplo, se reportó que tres llamas murieron en el zoológico de Londres pocas semanas después de haber estado en contacto con camellos recién importados desde Moscú. Los títulos séricos para *Brucella melitensis* fueron tan significativos como 1:1000, indicando una infección activa. A su vez, en un estudio de 1449 alpacas, se determinó que 20.9% tenía títulos de aglutinación en placa de 1:25. Sobre el 25% de las 79 personas que estaban en relación con esos animales desarrollaron títulos positivos, y algunos de ellos con fiebre ondulante (Murray, 1998).

Dentro de las exigencias para la importación de camélidos en Chile están, que el predio de origen debe ser libre de tuberculosis y brucelosis. Al respecto, a los animales en cuarentena se les realiza pesquisa de *Brucella* lisa por SAT y Rosa de Bengala (Chile, 1999).

A su vez, las normas con relación a la exportación incluyen diagnóstico. Por ejemplo para Estados Unidos, los permisos deben ser obtenidos del United State Department of Agriculture (USDA) requiriéndose un certificado oficial de salud proporcionado por un Médico Veterinario del SAG, y 60 días de cuarentena de preembarque, donde se realizan test para las enfermedades enumeradas como de cuarentena de máxima seguridad, entre las cuales está brucelosis y que deben ser aprobados por el USDA. Posteriormente se realiza una última cuarentena en USA, de mínimo 30 días, durante los cuales se le realizan los diagnósticos nuevamente (Murray, 1998).

Como se sabe, existen numerosas técnicas para el diagnóstico serológico de brucelosis, así aparte de las rutinarias por ser de alta utilización, como Rosa de Bengala (RB), Aglutinación Lenta en Tubo (SAT), y Fijación de Complemento (FC), otras técnicas, que son de unión primaria como Fluorescencia Polarizada (FP), y Elisa de Competencia (C-Elisa) han sido usadas en diferentes especies animales. Ellas varían de acuerdo a la especie bacteriana que se quiere estudiar pero, además, existe una variabilidad en el tipo de inmunoglobulina que se detecta así como en su sensibilidad y especificidad. Se sabe que las técnicas de unión primaria como las de FP y C-Elisa utilizadas en este estudio tienen alta sensibilidad y especificidad pero se desconoce la interpretación de sus resultados para CSA.

Cualquier técnica tiene que tener su adecuada forma de lectura o interpretación. Si bien es cierto algunas de ellas son meramente cualitativas, permitiendo por ejemplo visualizar grumos de aglutinación, indiferente a su magnitud o cantidad, otras son cuantitativas, siendo por ello necesario determinar, en general indirectamente, la cantidad de inmunoglobulinas que la muestra tiene. En el caso de los dos ensayos de unión primaria mencionadas, FP expresa su resultado en milipolarizaciones, en tanto C-Elisa en porcentaje de inhibición de color del sustrato cromógeno utilizado. Sin embargo, mientras no se determinen la significación de los valores que arrojen no tienen significado diagnóstico y esto se consigue determinando el valor umbral, y esto debe analizarse para cada especie animal y para cada realidad epidemiológica de los países que las utilicen.

El valor umbral se define como el nivel de anticuerpos que separa los animales negativos o positivos (Wright y col; 1993). Involucra directamente la sensibilidad y especificidad de la prueba, por lo cual es necesario determinar el destino del ensayo, adquiriendo de esta forma mucha importancia su elección y por supuesto el método estadístico que se emplee para calcularlo (Cargill y col; 1985).

Existen muchas formas de determinar el valor umbral. Si se calcula en relación a una prueba de oro, se obtendrá la sensibilidad y especificidad de la prueba que se está midiendo y estará directamente relacionada con estos parámetros para la prueba de oro.

Obviamente la prueba de oro ideal es el aislamiento del agente y la utilización del suero de los animales infectados para realizar el diagnóstico serológico. En ausencia de cultivos positivos, se utiliza aquel test serológico que tenga la correlación más estrecha con la del aislamiento. Sin embargo, el valor obtenido es válido para cada realidad epidemiológica y puede ser desplazado según la prevalencia del área en que se está aplicando (Jacobson, 1998).

Como se aprecia, el manejo sanitario predial así como la importación y exportación tienen un claro alcance con aspectos relacionados al diagnóstico. En este sentido Gilsdorf y col. (2001) experimentaron con llamas inoculándolas subcutáneamente con *Brucella abortus* cepa 19 pudiendo detectar anticuerpos anti-*Brucella* tanto por métodos convencionales como por un Elisa Indirecto. Igualmente pudieron detectar los anticuerpos en animales inoculados intraocularmente tanto desde un grupo inoculado con una dosis alta (1.02×10^8), como otro con dosis baja (9×10^5). Además, la inoculación de la cepa virulenta de *Brucella abortus* 2308

demostró que los organismos del género *Brucella* colonizan diferentes tejidos de estos animales desde los cuales pudo recuperarse por cultivo la cepa inoculada.

En relación a *Brucella* en Chile el diagnóstico en camélidos es esporádico, se realiza por el test de Aglutinación Lenta en Tubo, Rosa de Bengala, y eventualmente con Fijación de Complemento. Sin embargo, otras técnicas que han sido usadas en varias especies animales como bovinos, caprinos y otros, han demostrado una mayor sensibilidad y especificidad que las anteriormente mencionadas para el diagnóstico en camélidos. Por ello, el objetivo de esta tesis es ver la factibilidad de introducir las técnicas de Fluorescencia Polarizada (FP) y Elisa de Competencia (C-Elisa), en el diagnóstico de brucelosis en estas especies animales.

4. MATERIAL Y MÉTODOS.

4.1 MATERIAL

4.1.1 Muestras

Se trabajó con 336 muestras de suero sanguíneo, 315 de llamas y 21 de alpacas de un plantel ubicado en la IX Región en el que solamente se mantienen estas especies animales.

4.1.2 Equipo de laboratorio

a) Rosa de Bengala (RB).

- Bagueta de vidrio o plástico homogenizadora de antígeno-anticuerpo.
- Cronómetro.
- Fuente luminosa.
- Micropipeta para dispensar 30 μ l.
- Puntillas plásticas para micropipetas de 30 μ l.
- Placa de vidrio transparente y plana, cuadrículada.
- Toalla de papel desechable.

b) Aglutinación Lenta en Tubo (SAT).

- Dosificadores automáticos (aunque no imprescindibles) de 2 cc de capacidad, provistos de una aguja de 2.5 a 3 pulgadas de largo y de calibre 14-16. A falta de estos se puede hacer la distribución de antígeno con una pipeta de 10 ml de capacidad.
- Estufa: para incubar a 37 °C.
- Gradillas de alambre para sostener tubos: un tamaño conveniente es el que sirve para 15 pruebas de 4 a 6 tubos cada uno.
- Pipetas especialmente graduadas para 0.08; 0.04; 0.02 y 0.01 ml.
- Refrigerador: para almacenar muestras de sangre durante las pruebas.
- Tubos de serología tipo Wassermann de 13 mm por 100 mm, de vidrio claro y completamente limpios.

c) Fijación del Complemento (FC).

- Cinta adhesiva para cubrir la placa.
- Incubador.
- Micropipetas multicanal de 25 μ l.
- Micropipeta de 200 μ l.

- Microplacas de fondo redondo.
- Microdilutor de 50 μ l.
- Micropipetas de 1-100 μ l.
- Puntillas plásticas para micropipetas.
- Pipetas de vidrio graduadas de 10 ml.
- Rejillas para baño maría.
- Recipiente plástico para reactivos.
- Refrigerador y freezer.
- Tubos de inactivación .
- Vasos de precipitado plásticos y de vidrio.

d) Fluorescencia Polarizada (FP).

- Analizador de Fluorescencia polarizada (Diachemix Corporation^{MR}, modelo PS-1).
- Computador Compaq presario 1246.
- Cronómetro.
- Micropipetas para dispensar 20-100 μ l.
- Pipeta dosificadora para 1 ml.
- Puntillas para micropipeta.
- Refrigerador.
- Software de Fluorescencia Polarizada, Sentry Batch, versión 1.0 (Diachemix Corporation^{MR}).
- Tubos de ensayo de borosilicato de 75 mm de largo por 10 mm. de ancho.
- Vortex (Fisher Scientific^{MR}, modelo G 560 E).

e) Elisa de Competencia (C-Elisa).

- Agitador orbital de Microplacas (We mix 3^{MR}).
- Equipo purificador de agua Multi Q (tipo 1.18 Meg/nm).
- Balanza.
- Botellas de vidrio para depositar y almacenar las soluciones tampón.
- Cinta de sello para placas.
- Estufa a 25°C (Trilab^{MR}).
- Fotómetro lector de Elisa, con filtro de 405 nm (BDSL^{MR}, modelo Immunoskan Plus MK II).
- Lavador manual múltiple, de 12 salidas para microplacas (BDSL^{MR}).
- Micropipetas para dispensar de 5 μ l a 100 μ l.
- Microplacas de poliestireno NUNC 69620.
- Pipeta multicanal para dosificar 50 μ l y 100 μ l.
- Puntilla plásticas para micropipetas.
- Plumón para marcar las placas.
- Recipientes plásticos para uso de la pipeta multicanal.

- Refrigerador.
- Software SPEIA 1.03 (ADRI^{MR}).
- Toalla de papel desechable.
- Computador compatible con el programa computacional.
- Cronómetro.
- Impresora (Epson^{MR}, Modelo FX-850)

4.1.3 Productos Biológicos

a) Rosa de Bengala (RB).

- Sueros problemas.
- Antígeno Rosa de Bengala del Instituto de Microbiología, Universidad Austral de Chile (UACH).

b) Aglutinación Lenta en Tubo (SAT).

- Antígeno del Instituto de Microbiología, UACH.
- Sueros controles.

c) Fijación de Complemento (FC).

- Antígeno, del Instituto de Microbiología, UACH.
- Complemento, Laboratorio Central del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG).
- Eritrocitos de oveja.
- Sueros problemas.
- Suero hemolítico o hemolisina de conejo anti-oveja, de Bio Merieux.

d) Fluorescencia Polarizada (FP).

- Antígeno cadena O conjugado con fluoresceína elaborado en el Animal Disease Research Institute de Canadá (ADRI Nepean, Canadá).
- Sueros problemas.

e) Elisa de Competencia (C-Elisa).

- Antígeno lipopolisacárido (LPS), (ADRI, Canadá).
- Anticuerpo monoclonal M84, preparado por ADRI, Canadá.
- Anticuerpo IgG anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante, de Jackson laboratorios.
- Sueros controles: fuertemente positivos, débilmente positivos y negativos, proporcionados por la Universidad Austral de Chile, Instituto de Microbiología, Facultad de Ciencias.
- Sueros problemas.

4.1.4 Productos químicos.

a) Fijación de Complemento (FC).

- Solución Salina Tamponada Veronal (SVB): diluyente de FC.
- Solución Alsever.
- Solución Richardson.

b) Fluorescencia Polarizada (FP).

- Buffer Litiododecyl sulfato (LDS), pH 7.2. Temperatura de trabajo a 25°C.

NaN ₃ (Merck ^{MR}).....	1.00 g/l
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O (Merck ^{MR}).....	0.315 g/l
Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O (Merck ^{MR}).....	1.10 g/l
NaCl (Merck ^{MR}).....	8.50 g/l
C ₁₂ H ₂₅ LiO ₄ S (Merck ^{MR}).....	0.50 g/l

c) Elisa de Competencia (C-Elisa).

- Tampón carbonato (0.06M), pH 9.6: para adsorción de placas.
- Tampón fosfato (0.01M), pH 7.2 con NaCl y Tween 20 (PBST): para lavado.
- Tampón fosfato (0.01M), pH 6.3 con NaCl, Tween 20, 15mM EDTA y 15mM EGTA (PBST/EDTA/EGTA): tampón de dilución de sueros de prueba, sueros de control y anticuerpo monoclonal.
- Solución sustrato/Cromógeno: con Tampón citrato, H₂O₂ al 3% y ABTS (Sigma^{MR}), para medir la cantidad de enzima que se unió.

4.2 METODOS.

4.2.1 Obtención y procesamiento de las muestras.

Las 336 muestras de sangre, se obtuvieron mediante punción caudal, en tubos al vacío y llevadas al laboratorio, donde se dejaron en reposo a temperatura ambiente para la liberación del suero. Posteriormente el suero fue centrifugado a 1500 revoluciones por minuto (r.p.m.) durante 15 minutos y almacenado a $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.2 Exámenes realizados a las muestras.

- a) Prueba de Rosa de Bengala (RB). Determinando como positiva la presencia de grumos de aglutinación.
- b) Aglutinación Lenta en Tubo (SAT). Determinando como positivos títulos de 1:25 o superiores.
- c) Fijación de Complemento (FC). Determinando como positivos títulos de 1:10 o superiores.
- d) Fluorescencia Polarizada (FP). Determinando positividad de acuerdo al valor umbral a determinar.
- e) Elisa de Competencia (C-Elisa). Determinando positividad de acuerdo al valor umbral a determinar.

Las pruebas a), b), c) bastamente conocidas en el diagnóstico microbiológico de rutina, se realizaron conforme a la metodología descrita por Alton y col. (1988). Las pruebas d) y e) se describen en detalle por corresponder a métodos de incorporación posterior, en el diagnóstico serológico de brucelosis.

d) Fluorescencia Polarizada (Nielsen y col; 1996):

En cada tubo de ensayo se deposita 1ml de buffer fosfato Litiododecyl sulfato y a cada uno se le adiciona 10 μl de suero sanguíneo de prueba. Los sueros utilizados como controles son los siguientes: suero fuertemente positivo (++) , suero débilmente positivo (+), suero negativo (-) y control vacunados (CV).

Los sueros de control se preparan en forma similar a los sueros problemas en una dilución de 1:100 en tampón Litiododecyl sulfato, en cantidades de 10 μl de suero en 1000 μl de la solución tampón.

Posteriormente, todos los sueros, controles y de prueba, se agitan en un vortex y se someten a un primer ciclo de lectura en un analizador de Fluorescencia Polarizada el que debe estar encendido por lo menos 15 minutos previo al uso.

Luego de la primera lectura, a cada muestra se le adiciona 10 μl de antígeno marcado con fluoresceína. Se espera un tiempo de incubación de 2 minutos a temperatura ambiente.

Pasado el período de incubación, y en el mismo orden en que se analizaron en la primera lectura, cada muestra se agita individualmente en un vortex y se somete a la segunda lectura.

La diferencia de velocidad a que se mueven las partículas entre ambas lecturas es captada por el analizador de Fluorescencia Polarizada y es expresada en el valor recíproco en unidades de milipolarización (mP). A mayor formación de complejos inmunes, el número de mP será mayor y, por lo tanto más positiva la muestra.

Para suero sanguíneo bovino, los controles deben estar entre los siguientes límites:

Control (Suero)	mP
C ⁺⁺	200-240
C ⁺	100-140
C ⁻	75-90
CV	75-90

f) Elisa de Competencia (Nielsen y col; 1996).

Preparación de los tampones utilizados.

Tampón carbonato (0.06M), pH 9.6:

NaHCO ₃ (Merk ^{MR}).....	3.80 g/l
Na ₂ CO ₃ (Merk ^{MR}).....	1.93 g/l

Se preparan soluciones madres, las cantidades especificadas arriba se preparan por separado en la mitad del volumen total requerido de agua destilada deionizada, de manera tal que al unir cantidades iguales (a/a), la solución resultante sea de las características especificadas. Estas soluciones se mantienen a 4°C y al momento de usarlas se llevan a temperatura ambiente. Se mezclan las soluciones madres hasta alcanzar un pH 9.6. Este tampón es útil para inmovilizar lipopolisacáridos y otros polisacáridos.

Tampón fosfato (0.01M), pH 7.2 con NaCl y Tween 20:

Na ₂ HPO ₄ .(Merk ^{MR}).....	1.10 g/l
NaH ₂ PO ₄ (Merk ^{MR}).....	0.362 g/l
NaCl (Merk ^{MR}).....	0.85 g/l
Tween 20.(Sigma).....	0.50 ml/l

Se mezclan los fosfatos en agua destilada deionizada hasta alcanzar un pH 7.2 y agregar el NaCl y el Tween 20 controlando la estabilidad al pH. 7.2. Este tampón se puede almacenar a temperatura ambiente por una semana.

Tampón fosfato (0.01M), pH 6.3 con NaCl, Tween 20, 15mM EDTA y 15mM EGTA:

Tampón de lavado, el mismo especificado arriba.
EDTA (Merk^{MR}).....5.60 g/l
EGTA (Merk^{MR}).....6.72 g/l

Al tampón fosfato ya preparado se le agrega EDTA y EGTA y con NaOH 5.0M se ajusta el pH a 6.3. Este tampón es útil para reducir las interacciones no específicas.

Tampón citrato-ácido cítrico 0.05M, pH 4.5:

C₆H₈O₇ (Merk^{MR}).....4.60 g/l
Na₃C₆H₅O₇*2H₂O (Merk^{MR}).....7.65 g/l

Se prepara este tampón con agua destilada deionizada y se almacena a 4°C por una semana. Se utiliza con la enzima peroxidasa de rábano picante.

Solución sustrato/cromógeno (para 1 placa):

Tampón citrato, el que se describe arriba.....10.0 ml
H₂O₂ al 3%.....50 µl
ABTS (Sigma^{MR}).....250 µl

Al tampón citrato llevado a temperatura ambiente se le adicionan los demás componentes y se agita bien antes de usar. Esta solución debe ser preparada inmediatamente antes de su utilización.

Desarrollo de la técnica.

En primer lugar se preparan las microplacas NUNC someténdolas a la adsorción del antígeno LPS, diluido 1:1000 en tampón carbonato. El procedimiento consiste en recubrir las microplacas con el antígeno LPS, 100 µl por cada pocillo, que luego se dejan incubar por un período de 18 horas a 4°C. Durante este lapso se dejan tapadas con cinta selladora para protegerlas de la evaporación. Una vez terminado el recubrimiento, algunas microplacas se utilizan de inmediato y otras se almacenan a 4°C para su uso posterior. Previo al uso, cada microplaca se lava con tampón de lavado, por cuatro veces. Posteriormente se diluyen tanto los sueros de prueba como los sueros controles con tampón PBST/EDTA/EGTA (1:10). en una microplaca no adsorbida. La microplaca adsorbida y lavada, se cubre con el anticuerpo

monoclonal M84 diluido también en el tampón PBST/EDTA/EGTA, en cantidades de 50 µl por pocillo y luego se adicionan en iguales cantidades los sueros previamente diluidos.

Los sueros de prueba (1-88) y los sueros bovino de control, que incluyen un suero positivo fuerte C⁺⁺, un suero débilmente positivo C⁺, un suero negativo C⁻ y un control del conjugado Cc, son ubicados en cada microplaca según el siguiente esquema:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C ⁺⁺	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81
B	C ⁺⁺	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82
C	C ⁺	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83
D	C ⁺	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84
E	C ⁻	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85
F	C ⁻	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86
G	Cc	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87
H	Cc	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88

Posterior a esta etapa, se lleva la microplaca a un agitador orbital por 5 minutos y enseguida se deja incubar por 30 minutos a 25°C. Finalizado el período de incubación se realiza el ciclo de lavado, procediéndose luego a añadir el anticuerpo IgG anti-ratón de cabra y conjugado con peroxidasa de rábano picante, diluido en tampón PBST sin EDTA/EGTA. Se deja incubar por otros 30 minutos a 25°C. Pasado este tiempo, se lava la microplaca y se prepara para la lectura.

Se deposita la solución sustrato/cromógeno y se lleva al agitador orbital por 10 minutos a 25°C.

Finalmente se lee la microplaca en un espectrofotómetro a 405 nm. Los datos son analizados en el programa SPEIA 1.03, basándose en el cálculo del Porcentaje de Inhibición (%I), de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\%I = 100 - \left[\frac{\text{densidad óptica media de los pocillos de suero problema}}{\text{densidad óptica media de los pocillos de control conjugado}} \right] \times 100$$

4.3 ANALISIS ESTADISTICO

Para la determinación de los parámetros estadísticos, se utilizaron gráficos de concordancia a través del programa computacional estadístico MedCalc 97 versión 4. 15^a, y la mediana del último percentil para la determinación del valor de corte (umbral).

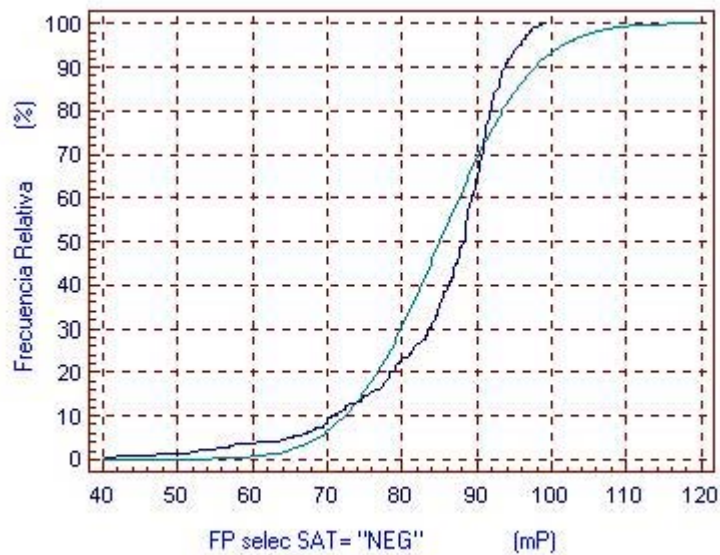
5. RESULTADOS

RESULTADOS DE LA APLICACIÓN DE LOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.

La aplicación de cada una de las pruebas (RB, SAT, FC, FP y C-Elisa) a cada muestra, se presentan en su totalidad en el anexo N° 1.

Sobre la base de estos resultados se obtuvo el valor de corte por determinación de la mediana del último percentil de la población en estudio. Para FP este fue de 98.7 mP y para C-Elisa de 32% I.

Estos valores se distribuyeron conforme a los gráficos que se presentan a continuación:



Línea verde: distribución normal.

Línea azul: distribución de la prueba

Gráfico 1: Distribución de Frecuencia relativa de sueros de camélidos sometidos al test de Fluorescencia Polarizada.

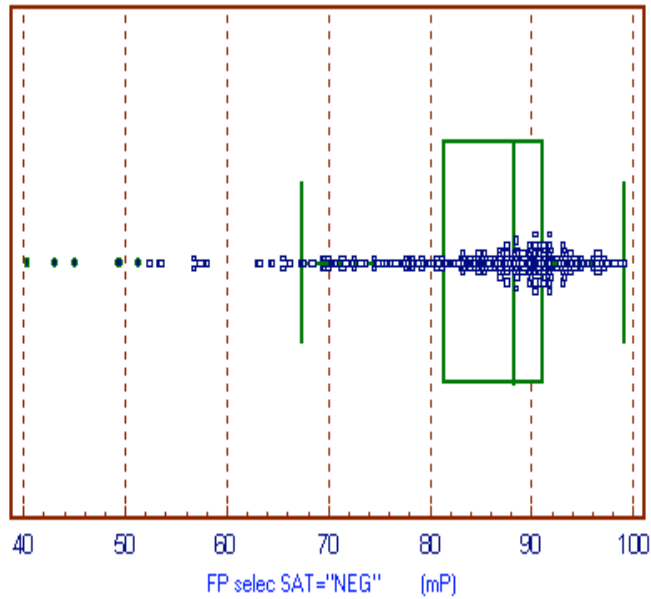
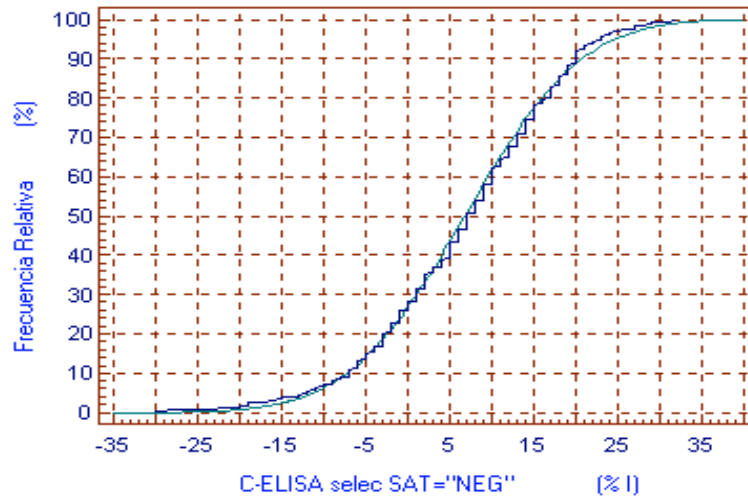


Gráfico 2: Distribución de Frecuencias de sueros de camélidos sometidos al test de Fluorescencia Polarizada con relación a las milipolarizaciones que arrojan.

El gráfico 2 presenta la distribución de las muestras de acuerdo a las mP que arrojaron.

El análisis estadístico de estos datos señala la media en 84.9mP y la mediana en 88.2mP y el valor de corte en 98.7 mP.



Línea verde: distribución normal.
 Línea azul: distribución de la prueba

Gráfico 3: Distribución de Frecuencia relativa de sueros de camélidos sometidos al test de C-Elisa.

El gráfico 3 expone la curva de distribución de las muestra al C-Elisa en relación a la curva normal.

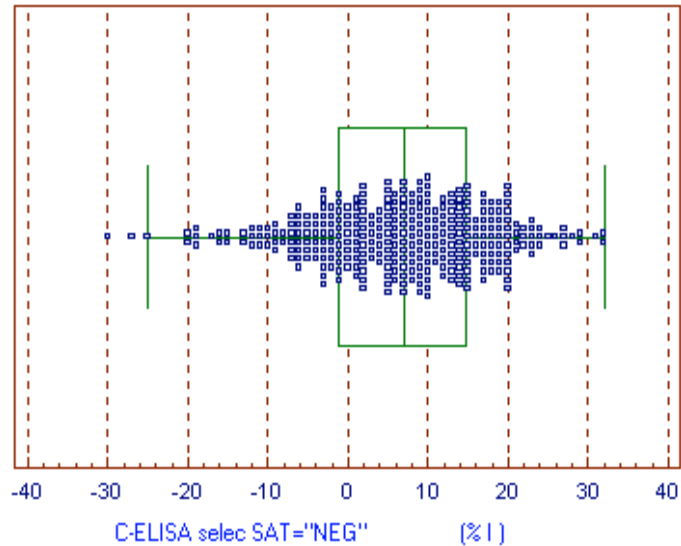


Gráfico 4: Distribución de Frecuencias de sueros de camélidos sometidos al test de C-Elisa con relación al porcentaje de inhibición que arrojan.

El análisis estadístico determinó la media en 6.6%I y la mediana en 7.0 %I y el valor de corte fue para este caso de 32%I.

En la Tabla 1 se entrega un resumen de los resultados obtenidos con las pruebas Rosa de Bengala (RB), Aglutinación Lenta en Tubo (SAT), Fluorescencia Polarizada (FP), y Elisa de Competencia (C-Elisa). Los resultados de la prueba de Fijación de Complemento (FC) se excluyen de esta tabla y se presentan en la Tabla 2 en razón del alto número de muestras anticomplementarias (A/C).

Tabla 1: Resultados del análisis de suero sanguíneo por las pruebas diagnósticas de RB, SAT, FP y C-Elisa aplicadas en llamas y alpacas.

Resultados	Llamas	Alpacas	Total	%
Neg a todas las pruebas	311	21	332	98.81
Neg a todo y Pos a C-Elisa	2	0	2	0.59
Neg a todo y Pos a FP	2	0	2	0.59
Total	315	21	336	100

Neg: Negativo

Pos: Positivo

De esta tabla se desprende que la suma de las muestras positivas a alguna de las pruebas diagnósticas (C-Elisa: 0.59% y FP: 0.59%) corresponden a un 1.18% del total de las muestras analizadas.

Tabla 2: Resultados del análisis de suero sanguíneo por la prueba de FC aplicada en llamas y alpacas.

Resultados FC	Llamas	Alpacas	Total	
			N°	%
Pos	0	1	1	0.3
Neg	276	19	295	87.8
A/C	39	1	40	11.9
Total	315	21	336	100

A/C: Anticomplementaria.

De esta tabla se puede concluir que para FC ninguna llama fue positiva, 276 fueron negativas y 39 fueron A/C, en cambio 1 alpaca fue positiva, 19 negativas y una sola A/C.

La Tabla 3 entrega una comparación de los sueros que resultaron positivos en algunas de las técnicas con relación a las restantes pruebas utilizadas.

Tabla 3: Comparación de los resultados obtenidos por las distintas pruebas diagnósticas, en muestras con una prueba positiva a *Brucella abortus*.

N° Autocrotal	RB	SAT	FP (mP)	C-Elisa (% I)
310	Neg	Neg	97.39	32
219	Neg	Neg	96.13	32
325	Neg	Neg	98.7	17
305	Neg	Neg	99.11	17

■ Muestra positiva

Sólo 2 animales reaccionaron positivamente a C-Elisa justo en el valor umbral y 2, levemente inferior al umbral en FP.

6. DISCUSIÓN

De acuerdo al objetivo de esta tesis, se determinó el valor de corte de dos técnicas inmunoenzimáticas (FP y C-Elisa). Para ello existen varias posibilidades tales como comparación con el aislamiento con un test de oro. Sin embargo, dado que en Chile, no hay experiencias en cuanto a aislamiento de *Brucella* en camélidos sudamericanos y los test que se utilizan en su diagnóstico, a la luz de experiencias realizadas en otros países en esta especie, no tiene los atributos de sensibilidad y especificidad ellas no pueden ser considerados como prueba de oro para la determinación del valor de corte.

Así por ejemplo, Abbas y Agab (2002) expresa que la especificidad para Fijación de Complemento (FC) es mucho mas alta que el de otras técnicas, sin embargo, el problema presentado en este estudio con FC fue que, pese a haber utilizado dos temperaturas diferentes para inhibición del complemento de los sueros problemas (60°C y 62°C) existió un alto número de sueros anticomplementarios, situación que descalifica el uso rutinario y como estándar de esta técnica.

Este mismo autor (Abbas y Agab, 2002) opina que Rosa de Bengala (RB) tiene una buena sensibilidad analítica en sueros de camélidos en comparación con Aglutinación Lenta en Tubo (SAT). Indudablemente esta ventaja detectada por RB estriba en que esta técnica detecta IgG₁ e IgG₂, sin detectar IgM. Como se sabe, esta última inmunoglobulina pentamérica, es causante de reacciones cruzadas con diferentes microorganismos con los cuales *Brucella* comparte epitopes a nivel de la cadena O. De este modo, obviar esta inmunoglobulina es valioso en cuanto a especificidad. Sin embargo, en una infección incipiente, es IgM la primera inmunoglobulina que se expresa en tanto que tarda algunos días en aparecer la IgG₁ y con cierta dilación se genera, posteriormente, IgG₂, situación que podría resultar en falsos negativos al utilizar RB.

Además, para que RB reaccione positivamente, se requiere una cantidad de IgG relativamente alta. Ambos antecedentes demuestran que tanto RB como SAT no podrán ser consideradas pruebas de oro, puesto que SAT tiene problema de especificidad y RB limitaciones en sensibilidad especialmente en infecciones incipientes (Nielsen y col. , 1996; Cherwonogrodzky y col., 2000).

La realidad chilena implica el uso de SAT como técnica oficial para camélidos sudamericanos (CSA), pero además se utiliza RB probablemente por su facilidad de ejecución y por su mayor especificidad. Sin embargo, las limitaciones ya señaladas para estas dos técnicas no hacen aconsejable utilizarlas como test de oro para la determinación del umbral.

Tomando en consideración que los animales muestreados provenían de un predio sin antecedentes clínicos, ni serológicos de brucelosis y que están confinados en un predio cerrado donde no hay copastoreo ni se crían otras especies que pudiesen actuar como reservorios de

Brucella, en origen, estos animales pueden considerarse negativos. Por esta razón, se optó por determinar el umbral en relación a la mediana del último percentil, técnica aplicable en poblaciones negativas (FAO, 1989) y que determinó un umbral de 98.7 mP para FP y 32% I para C-Elisa .

Una vez determinado el umbral, el análisis de los resultados del examen de suero sanguíneo de las 315 llamas y las 21 alpacas provenientes de la IX Región (Tabla 1) permite observar que, en la totalidad de las muestras (336) analizadas mediante RB, SAT, FP y C-Elisa, un 98.81% son negativas a todas las pruebas diagnósticas, en tanto un 1.18% (4 muestras) corresponden a muestras positivas a alguna de las pruebas y negativas al resto. Estas son 2 llamas (0.59%) positivas a la prueba de FP y otras 2 llamas (0.59%) positivas a la prueba de C-Elisa.

Como se aprecia, se excluyen de esta tabla los resultados a FC, en razón del alto número de muestras anticomplementarias. Las razones se plantearon en la Tabla 2, en que se visualiza que existen 40 muestras (11.90%), 39 llamas y 1 de alpaca que resultaron negativas a todas las pruebas y anticomplementarias (A/C) a la prueba de FC, por lo que estas muestras no pueden clasificarse como reaccionantes positivas o negativas. Dado el aumentado número de resultados anticomplementarios en la práctica esta prueba no podría utilizarse en el diagnóstico de brucelosis por lo menos en llamas y alpacas.

En relación a SAT, hubo muestras que tuvieron grumos de aglutinación inferiores a 1:25 y por ende no incluidas en categoría de positivas. La presencia de estos grumos se atribuye a especificidad de la técnica, considerando el historial del predio. Si el predio hubiese tenido antecedentes pasados de brucelosis, estos grumos podrían significar infección reciente.

De los resultados positivos a las pruebas de FP y C-Elisa presentados en la Tabla 3, se puede observar que en los dos casos en que C-Elisa presentó valores de inhibición de 32%, los resultados a la prueba de FP fueron cercanos al umbral establecido en este estudio (98.7 mP). Cabe recordar que el predio de origen de las muestras de camélidos no presenta antecedentes clínicos ni serológicos de la enfermedad. Así, las pruebas de unión primarias FP y C-Elisa podrían indicar la presencia de bajos títulos de inmunoglobulina en estos dos animales, por lo que en la práctica se recomendaría un nuevo muestreo con el fin de pesquisar mayores títulos en caso de desarrollarse la enfermedad. Con ello se dilucidaría un posible error del operador o un eventual estado inicial de infección, en que los títulos deberían subir en sangrados posteriores. Igualmente las 2 muestras positivas a FP, negativas a las otras pruebas y lejanas al valor de corte de C-Elisa (17% de inhibición), en la práctica ameritan repetición aunque la reacción de positividad fue mínima por estar ambas prácticamente en el valor de corte.

Por otro lado, si bien es cierto que las muestras provenían de un predio con características de población negativa a brucelosis, es decir, sin historial clínico de la enfermedad, y que los test de laboratorio han sido siempre negativos, estando además el rebaño aislado de manera que no hay movimiento de animales infectados desde el exterior y los campos adyacentes son conocidos como libres de la infección o de la enfermedad (Jacobson, 1998), cabe recordar que la brucelosis bovina es endémica de la Región. Esto

representa un cierto contacto de todos los animales y el hombre con la *Brucella* como antígeno. Así las especies animales, aunque sin enfermar, pueden generar cierta cantidad de inmunoglobulinas pesquisables por técnicas altamente sensibles como lo son FP y C-Elisa.

Desde un punto de vista práctico, las ventajas de la técnica de FP son su fácil ejecución, bajo costo y realizable en terreno. Por otra parte, la experiencia en diagnóstico de brucelosis bovina, demuestra su capacidad de evitar positivos vacunales, ya que no detecta anticuerpos resultados de la vacunación con cepa 19. Pese a que la vacunación con esta cepa ya no se practica en Chile en el bovino, este dato pudiese ser de importancia en países que si la utilizan y que, eventualmente, pudieran introducirla en camélidos (Dahoo y col; 1986). Además, se requiere de solo un antígeno, un solo tampón y la ejecución de una sola muestra no demora más de 5 minutos. Además, los resultados son registrados de manera sencilla mediante programas computacionales de fácil manejo, donde el sistema de lectura de resultados es automático de modo que su aplicación resulta objetiva. Su desventaja podría radicar en la inversión inicial que se debe realizar para adquirir el analizador de Fluorescencia Polarizada.

A su vez, las ventajas de introducir C-Elisa estriban en: su eficiencia y objetividad. Los costos de implementación han ido bajando debido a que los equipos pueden utilizarse para el diagnóstico de otras enfermedades, con la consecuente masificación de la técnica y capacitación del personal. El diagnóstico en si se hace con bastante rapidez y precisión, y al igual que FP, diferencia anticuerpos de infección de aquellos generados por cepa 19 (Nielsen y col; 1992).

En consecuencia con los resultados comentados, es posible resaltar que en llamas y alpacas:

- RB y SAT no alcanzaron nivel de positividad en la pesquisa de anticuerpos anti *Brucella*.
- FC presentó un alto porcentaje de anticomplementariedad por lo tanto no sería una técnica recomendable bajo las condiciones estudiadas.
- El nivel de corte para FP y C-Elisa fue de 98.7 mP y de 32% I respectivamente.
- FP y C-Elisa detectaron un escaso número de animales reaccionantes, muy cerca del valor umbral.
- La detección del valor de corte de ambas técnicas permite la utilización de ellas en predios de los cuales se desconoce la prevalencia de brucelosis.

7. BIBLIOGRAFÍA.

ABBAS, H.; H. AGAB. 2002. A review of camel brucellosis. *Prev Vet Med* 55: 47-56.

ALTON, G. G.; L. M. JONES; R.D. ANGUS; J.M. VERGER. 1988. Techniques for the Brucellosis laboratory. Institute national de la Recherche Agronomique, París. Francia.

BAS, F.; F. GONZÁLEZ. 1990. Antecedentes para la producción de Alpacas en la zona central de Chile. Panorama Económico de la Agricultura.

CARGILL, C.; K. LEE; I. CLARKE. 1985. Use of an enzyme linked immunosorbent assay in a bovine brucellosis eradication program. *Aust. Vet. J.* 62: 49-52.

CHERWONOGRODZKY, J.; G. DUBRAY; E. MORENO; H. MAYER. 2000. Antigens of Brucella in Animal Brucellosis. Eds; Klaus Nielsen, J. Robert Duncan, Florida. USA.

CHILE. 1997. INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICAS (INE); VI Censo Agropecuario Nacional.

CHILE.1999. MINISTERIO DE AGRICULTURA; SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO; DEPARTAMENTO DE PROTECCIÓN PECUARIA. Informe: Exigencias sanitarias para la internación de camélidos a Chile.

CHILE. 2000. FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA. (F.I.A.). Camélidos en Chile, situación actual y perspectivas. Ministerio de Agricultura, Santiago. Chile.

DAHOO, I.; P. WRIGTH; G. RUCKERBAUER; B. SAMAGH; ROBERTSON; L. FORBES. 1986. A comparison of five serological test for bovine brucellosis. *Can. J. Vet. Pres.* 50: 485-493

FAO/ IAEA, Food Agricultural Organization/International Atomic Energy Agency. 1989. Division Elisa Kit For Animal Disease Diagnosis. Agriculture Laboratory. Animal Production and Health Unit, Seibersdorf. Austria.

FAO, Food Agricultural Organization. 1996. Manual de prácticas de manejo de Alpacas y Llamas, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma. Italia.

FERNÁNDEZ-BACA, S. 1991. Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos Sudamericanos. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la alimentación, Santiago. Chile.

GILSDORF, M.J. ; C.O THOEN; R.M TEMPLE; T. GIDLEWSKI; D. EWALT; B. MARTIN; S.B HENNEGER. 2001. Experimental exposure of llamas (*Lama glama*) to *Brucella abortus*: humoral antibody response. *Vet. Microbiol.* 81: 85-91

HILL, P. 1999. Alpacas: Requisitos para un buen manejo y comercialización. *Agroanálisis.* 5: 10-12, Santiago. Chile.

JACOBSON, R. H. 1998. Some factors in selecting serum samples for use in determining the positive/negative threshold (cutoff) in Elisa. New York State College of Veterinary Medicine Cornell University. USA.

MURRAY, E. 1998. Medicine and surgery of South American camelids Llama- Alpaca- Vicuña- Guanaco. 2nd ed.; Iowa State University Press/Ames. USA.

NIELSEN, K.; D. GALL; W. A. KELLY; M. D. HENNING; M. M. GARCÍA. 1992. Enzyme Immunoassay Application to diagnosis of bovine brucellosis. Agriculture and Agri-food Canada, Nepean, Ontario, Canada.

NIELSEN, K. ; D. GALL; W. A. KELLY; A. M. VIGLIOCO; M. D. HENNING; M.M.GARCÍA. 1996. Application to Enzyme Immunoassay for the diagnosis of brucellosis. Traducido al Español por Andrea Contreras, Valdivia. Chile.

PIZARRO, E. 1998. Causales de decomiso en camélidos Sudamericanos beneficiados en matadero en la ciudad de Arica durante el período 1988-1996. Tesis, M. V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.

RAGGI, L. 1992. Camélidos, una opción ganadera. *El campesino.* 7: 16-23, Santiago. Chile.

RAGGI, L. 1998. La exportación de animales vivos. En: Manejo sustentable de la vicuña y el guanaco. Actas del seminario internacional realizado en la Pontificia Universidad Católica de Chile. Eds. Benito González, Fernando Bas, Charif Tala, Agustín Iriarte. Subdepartamento de Divulgación Técnica. SAG, Santiago. Chile.

RAGGI, L. 2001. Los camélidos Sudamericanos domésticos, Llama y Alpaca. www.mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/apciencias.veterinarias.y.pecuarias

ROTTMANN, J. 1981. Situación de los camélidos en Chile. En Actas de la IV convención internacional sobre camélidos sudamericanos, Punta Arenas. Chile, pp: 70-75.

SARNO, R; W. L. FRANKLIN; S. J. O'BRIEN; W. E. JOHNSON. 1998. Uso de marcadores genéticos para la conservación de los camélidos sudamericanos silvestres. En: Manejo sustentable de la vicuña y el guanaco. Actas del seminario internacional realizado en la Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago. Chile. pp: 47-53.

TORRES, H. 1992. South American Camelids An Action Plan for their Conservation. IUCN, Gland, Switzerland.

WRIGHT, P. F.; E. NILSSON; E. VAN ROODIJ; M. LETENTA; M. JEGGO. 1993. Standardization and validation of enzyme linked immunosorbent assay techniques for detection of antibody in infectious diagnosis. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 12: 435-450.

ANEXOS

Anexo N° 1 Resultados de las pruebas RB, SAT, FC, FP y C-Elisa en muestras de suero de llamas y alpacas.

N°	ESPECIE	RB	SAT	FC	FP (mP)	C-Elisa (%)	N°	ESPECIE	RB	SAT	FC	FP (mP)	C-Elisa (%)
1		NEG	NEG	NEG	40.33	5	56		NEG	NEG	NEG	53.31	-7
2		NEG	NEG	NEG	67.71	2	57		NEG	NEG	NEG	91.9	8
3		NEG	NEG	A/C	68.39	5	58		NEG	NEG	NEG	75.27	3
4		NEG	NEG	NEG	74.54	0	59		NEG	NEG	A/C	88.25	10
5		NEG	NEG	A/C	80.77	9	60		NEG	NEG	NEG	90.8	-20
6		NEG	NEG	NEG	80.83	-1	61		NEG	NEG	NEG	93.21	18
7		NEG	NEG	NEG	85.12	8	62		NEG	NEG	NEG	94.2	-13
8		NEG	NEG	NEG	90.44	13	63		NEG	NEG	NEG	85.2	15
9		NEG	NEG	NEG	87.25	24	64		NEG	NEG	NEG	69.68	2
10		NEG	NEG	NEG	87.93	15	65		NEG	NEG	NEG	87.3	14
11		NEG	NEG	NEG	91.25	1	66		NEG	NEG	NEG	94.25	24
12		NEG	NEG	NEG	91.29	10	67		NEG	NEG	NEG	91.5	7
13		NEG	NEG	NEG	86.39	14	68		NEG	NEG	NEG	53.6	2
14		NEG	NEG	NEG	91.72	12	69		NEG	NEG	NEG	81.23	7
15		NEG	NEG	NEG	89.12	-3	70		NEG	NEG	NEG	75.66	4
16		NEG	NEG	A/C	90.7	19	71		NEG	NEG	NEG	90.8	6
17		NEG	NEG	NEG	93.1	-12	72		NEG	NEG	NEG	91.69	15
18		NEG	NEG	NEG	69.48	3	73		NEG	NEG	NEG	91.92	8
19		NEG	NEG	NEG	91.65	-12	74		NEG	NEG	NEG	69.68	11
20		NEG	NEG	NEG	43.16	2	75		NEG	NEG	NEG	91.98	20
21		NEG	NEG	NEG	80.98	-6	76		NEG	NEG	A/C	85.29	2
22		NEG	NEG	NEG	91.29	28	77		NEG	NEG	NEG	90.54	14
23		NEG	NEG	NEG	93.1	15	78		NEG	NEG	NEG	76.15	1
24		NEG	NEG	NEG	74.72	2	79	A	NEG	NEG	NEG	56.79	-7
25		NEG	NEG	NEG	68.42	23	80		NEG	NEG	NEG	93.21	27
26		NEG	NEG	NEG	93.85	20	81		NEG	NEG	NEG	87.4	16
27		NEG	NEG	NEG	91.86	17	82		NEG	NEG	A/C	94.5	9
28		NEG	NEG	NEG	94	8	83		NEG	NEG	NEG	81.39	22
29		NEG	NEG	NEG	90.46	20	84		NEG	NEG	NEG	91.62	20
30		NEG	NEG	A/C	86.49	5	85		NEG	NEG	NEG	69.99	-3
31		NEG	NEG	NEG	90.71	4	86		NEG	NEG	NEG	76.61	-2
32		NEG	NEG	NEG	91.3	-1	87		NEG	NEG	NEG	91.7	-19
33	A	NEG	NEG	NEG	93.2	-16	88		NEG	NEG	NEG	90.8	-3
34		NEG	NEG	A/C	85.18	8	89	A	NEG	NEG	NEG	91.94	-4
35		NEG	NEG	NEG	91.65	19	90		NEG	NEG	NEG	81.5	15
36		NEG	NEG	NEG	94.2	-1	91		NEG	NEG	A/C	89.2	13
37		NEG	NEG	NEG	95.4	2	92		NEG	NEG	NEG	88.3	14
38		NEG	NEG	NEG	45.16	4	93		NEG	NEG	NEG	87.48	17
39		NEG	NEG	NEG	95.54	25	94		NEG	NEG	NEG	77.1	1
40		NEG	NEG	NEG	96.04	23	95		NEG	NEG	NEG	88.1	20
41		NEG	NEG	NEG	74.76	-19	96		NEG	NEG	NEG	90.62	19
42		NEG	NEG	NEG	90.76	29	97		NEG	NEG	NEG	93.3	10

43		NEG	NEG	NEG	91.35	7
44		NEG	NEG	NEG	81.16	0
45		NEG	NEG	NEG	93.2	-11
46		NEG	NEG	NEG	86.52	-5
47		NEG	NEG	NEG	74.99	-2
48		NEG	NEG	NEG	69.52	3
49		NEG	NEG	A/C	90.43	16
50		NEG	NEG	NEG	51.35	2
51		NEG	NEG	NEG	90.5	10
52		NEG	NEG	NEG	91.69	16
53	A	NEG	NEG	NEG	86.6	-4
54		NEG	NEG	NEG	81.17	5
55		NEG	NEG	NEG	91.49	13

98		NEG	NEG	NEG	56.79	0
99		NEG	NEG	A/C	90.86	10
100		NEG	NEG	NEG	81.64	5
101	A	NEG	NEG	NEG	91.72	5
102		NEG	NEG	NEG	93.3	5
103		NEG	NEG	NEG	94.6	22
104		NEG	NEG	NEG	77.19	10
105		NEG	NEG	NEG	90.87	16
106		NEG	NEG	NEG	85.36	-3
107		NEG	NEG	NEG	94.7	1
108		NEG	NEG	NEG	81.93	3
109	A	NEG	NEG	NEG	70.42	-7
110		NEG	NEG	NEG	90.7	13

Anexo N° 1 Resultados de las pruebas RB, SAT, FC, FP y C-Elisa en muestras de suero de llamas y alpacas.

N°	ESPECIE	RB	SAT	FC	FP (mP)	C-Elisa (%)
111		NEG	NEG	NEG	70.01	1
112		NEG	NEG	NEG	87.5	18
113		NEG	NEG	NEG	77.43	12
114		NEG	NEG	A/C	90.42	9
115		NEG	NEG	NEG	57.44	1
116		NEG	NEG	NEG	90.92	20
117		NEG	NEG	NEG	93.6	-10
118		NEG	NEG	NEG	88.3	20
119		NEG	NEG	NEG	82.3	1
120		NEG	NEG	NEG	94.8	23
121		NEG	NEG	NEG	89.2	15
122		NEG	NEG	NEG	77.55	-1
123		NEG	NEG	NEG	91	15
124		NEG	NEG	NEG	93.71	31
125		NEG	NEG	A/C	86.94	9
126		NEG	NEG	NEG	94.89	21
127		NEG	NEG	NEG	88.31	17
128		NEG	NEG	NEG	83.98	10
129		NEG	NEG	NEG	70.18	4
130		NEG	NEG	NEG	93.8	7
131		NEG	NEG	NEG	89.13	22
132		NEG	NEG	NEG	77.6	9
133		NEG	NEG	NEG	82.37	-1
134		NEG	NEG	NEG	89.26	6
135		NEG	NEG	NEG	85.4	0
136		NEG	NEG	NEG	91.03	-16
137		NEG	NEG	A/C	91.98	-30

N°	ESPECIE	RB	SAT	FC	FP (mP)	C-Elisa (%)
166	A	NEG	NEG	A/C	78.05	3
167		NEG	NEG	NEG	92.12	-3
168		NEG	NEG	NEG	71.36	10
169		NEG	NEG	NEG	90.4	-5
170		NEG	NEG	NEG	89.47	7
171		NEG	NEG	NEG	84.12	12
172		NEG	NEG	NEG	83.04	2
173		NEG	NEG	NEG	78.09	5
174		NEG	NEG	NEG	87.55	-7
175		NEG	NEG	A/C	88.84	14
176		NEG	NEG	NEG	92.16	-15
177		NEG	NEG	NEG	88.39	21
178		NEG	NEG	NEG	85.44	8
179		NEG	NEG	NEG	71.39	-6
180		NEG	NEG	NEG	92.26	-25
181		NEG	NEG	NEG	86.96	9
182		NEG	NEG	NEG	83.22	6
183		NEG	NEG	NEG	78.19	14
184		NEG	NEG	NEG	90.4	12
185		NEG	NEG	NEG	63.35	6
186	A	NEG	NEG	NEG	89.62	17
187		NEG	NEG	A/C	84.2	19
188		NEG	NEG	NEG	78.24	-2
189		NEG	NEG	NEG	90.39	23
190		NEG	NEG	NEG	88.4	10
191		NEG	NEG	NEG	83.23	-5
192		NEG	NEG	NEG	87.56	13

138		NEG	NEG	NEG	57.96	1
139		NEG	NEG	NEG	93.8	-6
140		NEG	NEG	NEG	77.65	4
141	A	NEG	NEG	NEG	52.43	4
142		NEG	NEG	NEG	89.3	15
143		NEG	NEG	A/C	82.5	18
144		NEG	NEG	NEG	88.36	14
145		NEG	NEG	NEG	70.57	18
146		NEG	NEG	NEG	86.95	5
147		NEG	NEG	NEG	91.08	8
148		NEG	NEG	NEG	84.06	7
149		NEG	NEG	NEG	92	-19
150		NEG	NEG	NEG	77.77	2
151		NEG	NEG	NEG	82.9	19
152		NEG	NEG	A/C	93.1	-3
153		NEG	NEG	NEG	92	-9
154	A	NEG	NEG	NEG	87.54	-11
155		NEG	NEG	NEG	92.1	-11
156		NEG	NEG	NEG	84.07	13
157		NEG	NEG	A/C	91.09	20
158		NEG	NEG	NEG	70.69	-6
159		NEG	NEG	NEG	89.41	13
160	A	NEG	NEG	NEG	49.52	-4
161		NEG	NEG	NEG	63.2	-8
162		NEG	NEG	A/C	82.99	20
163		NEG	NEG	NEG	88.39	21
164		NEG	NEG	NEG	94.9	10
165		NEG	NEG	NEG	85.4	12

193		NEG	NEG	NEG	92.2	-20
194		NEG	NEG	NEG	92.3	12
195		NEG	NEG	NEG	78.35	-2
196		NEG	NEG	NEG	88.7	18
197		NEG	NEG	NEG	92.46	17
198		NEG	NEG	NEG	86.98	13
199		NEG	NEG	NEG	83.26	0
200		NEG	NEG	NEG	71.7	-6
201		NEG	NEG	NEG	88.4	18
202		NEG	NEG	NEG	89.62	8
203		NEG	NEG	NEG	84.42	6
204		NEG	NEG	NEG	90.39	7
205		NEG	NEG	A/C	88.9	20
206		NEG	NEG	NEG	78.35	14
207		NEG	NEG	NEG	72.36	1
208		NEG	NEG	NEG	64.41	-2
209		NEG	NEG	NEG	83.29	10
210		NEG	NEG	NEG	83.3	18
211		NEG	NEG	NEG	88.67	-9
212		NEG	NEG	NEG	88.43	-13
213	A	NEG	NEG	NEG	92.5	-5
214		NEG	NEG	NEG	85.52	6
215		NEG	NEG	NEG	92.7	7
216		NEG	NEG	NEG	72.46	-1
217		NEG	NEG	NEG	89	-5
218		NEG	NEG	A/C	78.36	9
219		NEG	NEG	NEG	96.13	32
220	A	NEG	NEG	NEG	88.66	-6

Anexo N° 1 Resultados de las pruebas RB, SAT, FC, FP y C-Elisa en muestras de suero de llamas y alpacas.

N°	ESPECIE	RB	SAT	FC	FP (mP)	C-Elisa (%)
221		NEG	NEG	NEG	87.2	-5
222	A	NEG	NEG	NEG	84.47	-12
223		NEG	NEG	NEG	92.95	15
224		NEG	NEG	NEG	87.57	9
225		NEG	NEG	NEG	90.3	11
226		NEG	NEG	NEG	72.47	-4
227		NEG	NEG	NEG	88.43	-3
228		NEG	NEG	NEG	89.63	-2
229		NEG	NEG	NEG	84.54	14
230		NEG	NEG	NEG	78.76	8

N°	ESPECIE	RB	SAT	FC	FP (mP)	C-Elisa (%)
276		NEG	NEG	NEG	93	-10
277		NEG	NEG	NEG	85.95	-8
278		NEG	NEG	NEG	86.87	15
279		NEG	NEG	NEG	65.56	4
280		NEG	NEG	A/C	96.8	11
281		NEG	NEG	NEG	97.05	26
282		NEG	NEG	A/C	89.8	10
283		NEG	NEG	NEG	79.67	3
284		NEG	NEG	NEG	97.05	24
285		NEG	NEG	NEG	88.53	10

231		NEG	NEG	NEG	64.59	10
232		NEG	NEG	NEG	96.08	23
233		NEG	NEG	NEG	96.11	17
234		NEG	NEG	A/C	78.94	5
235		NEG	NEG	NEG	88.64	6
236		NEG	NEG	NEG	90.3	-4
237		NEG	NEG	A/C	85.6	9
238		NEG	NEG	NEG	89.06	6
239		NEG	NEG	NEG	87.6	13
240	A	NEG	NEG	NEG	84.6	6
241		NEG	NEG	A/C	72.54	5
242		NEG	NEG	NEG	78.99	9
243		NEG	NEG	NEG	89.7	19
244		NEG	NEG	A/C	90.25	9
245		NEG	NEG	NEG	89.08	-2
246		NEG	NEG	NEG	85.84	14
247	A	NEG	NEG	NEG	84.64	-2
248		NEG	NEG	NEG	88.6	29
249		NEG	NEG	NEG	87.23	5
250		NEG	NEG	NEG	65.53	-1
251		NEG	NEG	NEG	87.65	9
252		NEG	NEG	NEG	88.48	7
253		NEG	NEG	NEG	79.13	11
254		NEG	NEG	NEG	89.78	8
255		NEG	NEG	NEG	93	-4
256		NEG	NEG	NEG	96.22	20
257		NEG	NEG	A/C	84.7	8
258		NEG	NEG	NEG	90.15	-3
259		NEG	NEG	NEG	88.6	5
260		NEG	NEG	NEG	96.54	17
261		NEG	NEG	NEG	72.57	-1
262		NEG	NEG	NEG	87.7	19
263		NEG	NEG	NEG	79.21	12
264		NEG	NEG	A/C	86.91	12
265		NEG	NEG	NEG	90.15	7
266		NEG	NEG	NEG	96.55	18
267		NEG	NEG	NEG	84.71	9
268		NEG	NEG	NEG	88.56	-10
269		NEG	NEG	NEG	88.5	10
270		NEG	NEG	NEG	73.17	1
271		NEG	NEG	NEG	96.56	27
272		NEG	NEG	NEG	90.01	15
273		NEG	NEG	NEG	87.74	-9
274		NEG	NEG	A/C	91.1	11
275		NEG	NEG	NEG	79.24	-7

286		NEG	NEG	NEG	86.85	-3
287		NEG	NEG	NEG	85.98	7
288		NEG	NEG	A/C	73.59	2
289		NEG	NEG	A/C	87.82	14
290		NEG	NEG	NEG	84.71	-1
291		NEG	NEG	A/C	79.77	11
292		NEG	NEG	NEG	87.88	0
293		NEG	NEG	NEG	88.5	13
294	A	NEG	NEG	NEG	90	7
295		NEG	NEG	NEG	86.12	12
296		NEG	NEG	NEG	91.1	19
297		NEG	NEG	NEG	83.8	0
298		NEG	NEG	NEG	84.78	-3
299		NEG	NEG	NEG	89.8	20
300		NEG	NEG	NEG	93	-9
301		NEG	NEG	A/C	95.03	16
302		NEG	NEG	NEG	83.38	-1
303		NEG	NEG	NEG	89.92	14
304		NEG	NEG	NEG	95.1	-1
305		NEG	NEG	NEG	99.11	17
306		NEG	NEG	NEG	84.89	-3
307		NEG	NEG	NEG	97.18	17
308		NEG	NEG	NEG	91.1	-15
309	A	NEG	NEG	NEG	86.26	7
310		NEG	NEG	NEG	97.39	32
311		NEG	NEG	NEG	89.89	6
312		NEG	NEG	NEG	89.81	9
313		NEG	NEG	A/C	86.8	19
314		NEG	NEG	A/C	83.39	12
315		NEG	NEG	NEG	66.32	-6
316		NEG	NEG	NEG	89.82	-3
317		NEG	NEG	NEG	91.13	21
318	A	NEG	NEG	NEG	93	-27
319		NEG	NEG	A/C	74.51	13
320		NEG	NEG	NEG	89.85	15
321		NEG	NEG	NEG	97.91	27
322		NEG	NEG	NEG	98.16	17
323		NEG	NEG	NEG	86.29	2
324		NEG	NEG	NEG	91.18	18
325		NEG	NEG	NEG	98.7	17
326		NEG	NEG	A/C	88.5	20
327	A	NEG	NEG	POS	85.01	7
328		NEG	NEG	NEG	79.87	-6
329		NEG	NEG	NEG	89.89	11
330		NEG	NEG	NEG	67.33	5

Anexo N° 1 Resultados de las pruebas RB, SAT, FC, FP y C-Elisa en muestras de suero de llamas y alpacas.

N°	ESPECIE	RB	SAT	FC	FP (mP)	C-Elisa (%)
331		NEG	NEG	NEG	88.5	15
332	A	NEG	NEG	NEG	85.1	0
333		NEG	NEG	NEG	80.04	-7
334		NEG	NEG	NEG	86.65	-17
335		NEG	NEG	NEG	80.35	6
336		NEG	NEG	NEG	67.45	2