

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Instituto de Bioquímica y Microbiología
Facultad de Ciencias

**RESPUESTA INMUNE HUMORAL DE CARNERILLOS DESPUÉS DE LA
VACUNACIÓN DE REFUERZO CON *Brucella abortus* CEPA RB51 ASOCIADA A UN
ADYUVANTE**

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

CONSTANZA ALEJANDRA PINILLA SUÁREZ
VALDIVIA – CHILE

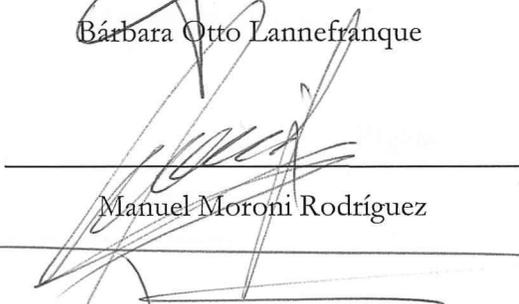
2018

PROFESOR PATROCINANTE

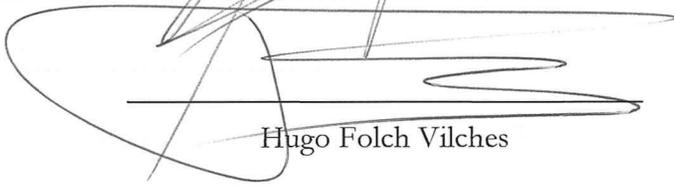


Bárbara Otto Lannefranque

PROFESORES INFORMANTES



Manuel Moroni Rodríguez



Hugo Folch Vilches

FECHA DE APROBACIÓN: 27 de julio de 2018

ÍNDICE

Capítulos	Página
1. RESUMEN.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	7
5. RESULTADOS.....	10
6. DISCUSIÓN.....	16
7. REFERENCIAS.....	19
8. ANEXOS.....	22

1. RESUMEN

La brucelosis ovina ocasionada por *Brucella ovis* es un problema importante a nivel de la producción ovina nacional, no existiendo métodos eficientes de control y prevención como lo es la vacunación, por lo que se busca hallar alternativas seguras que puedan emplearse para su prevención y que no interfieran con las barreras zoonositarias del país.

Se utilizó un banco de 304 sueros obtenidos a partir de 19 carnerillos separados de manera aleatoria en tres grupos, dos de 6 animales y uno con 7 animales, de los cuales dos grupos fueron vacunados con *Brucella abortus* cepa RB51 en dos oportunidades, empleando con la segunda dosis el uso del adyuvante Montanide™ Gel en uno de los grupos. Las muestras fueron obtenidas mediante muestreos seriados realizando venopunción yugular de los carnerillos.

Se elaboró una prueba de Enzimo Inmuno Ensayo Indirecto (I-ELISA) y su estandarización empleando antígenos vaccinales de la cepa RB51 y *Brucella ovis* obtenidos mediante el protocolo de purificación de extracto salino para evaluar la respuesta inmune humoral de los carnerillos vacunados durante el período de estudio.

La respuesta inmune humoral en los grupos vacunados comienza a ser notoriamente perceptible a nivel del día 97 tanto al emplear los antígenos de RB51 ($p < 0.0183$) como los de *B. ovis* ($p < 0.002$), manteniéndose esta respuesta elevada hasta el día 135 para posteriormente darse una baja en los títulos de anticuerpos (RB51 $p < 0.007$; *B. ovis* $p < 0.01$). Por otra parte, el grupo control se mantiene dentro de rangos negativos para la prueba de I-ELISA.

Al emplear los antígenos de RB51, se determina que al emplear el adyuvante en la segunda dosis se genera un incremento en los títulos de anticuerpos ($p < 0,018$), mientras que con los antígenos de *B. ovis* no se genera una diferencia significativa ($p > 0.117$). Comparando las curvas de anticuerpos obtenidas al emplear los distintos antígenos, se obtienen valores más elevados al emplear los antígenos de *B. ovis* que los de RB51, a excepción del grupo 3, en el que se utilizó el adyuvante ($p > 0.325$).

Se concluye que la utilización de dos dosis de la vacuna *Brucella abortus* cepa RB51 genera una fuerte respuesta inmune humoral en carnerillos, la que es incrementada con el uso del adyuvante Montanide™ Gel junto a la segunda dosis vaccinal. Asimismo, existe una respuesta inmune cruzada entre los antígenos de RB51 y *B. ovis*, lo que determina una interferencia diagnóstica mediante la técnica de I-ELISA. Por otra parte, se requieren de futuras investigaciones para demostrar la efectividad protectora de la cepa RB51 frente a *B. ovis*.

Palabras clave: *Brucella abortus* cepa RB51, carnerillos, I-ELISA, adyuvante

Fuente de financiamiento: Proyecto VT-UACH Joint Research Program Seed Grant: “Prevention of *Brucella ovis* induced pathology in rams through vaccination”

2. SUMMARY

HUMORAL IMMUNE RESPONSE AFTER BOOSTER VACCINATION WITH *Brucella abortus* STRAIN RB51 ASSOCIATED TO AN ADJUVANT IN RAMS

Ovine brucellosis due to *Brucella ovis* is an important problem in the national sheep production, not having efficient control and prevention methods such as vaccination. In Europe, this infection is prevented using the Rev.1 vaccine, an attenuated strain of *B. melitensis*, which cannot be used because Chile is free from *B. melitensis*. For that, in search of safe alternatives that can be used to prevent the disease and not interfere with the zoosanitary barriers of the country, we tested *B. abortus* strain RB51 as a vaccine in rams. This study was developed to determine the humoral immune response in rams using this vaccine

A bank serum of 304 samples obtained from 19 rams separated randomly in three groups, two of six animals and one of 7 animals, which two of them were vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51 twice, using in one of the groups the adjuvant Montanide™ Gel in the booster. The samples were obtained through serial sampling by performing jugular venopuncture of the rams.

An Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (I-ELISA) and its standardization were developed using vaccination antigens of the RB51 strain and *Brucella ovis* antigens obtained by the hot saline extract purification protocol, in order to determine cross-reaction against vaccination.

The humoral immune response in the vaccinated groups begins to be noticeable at day 97 using both antigens of RB51 ($p < 0.0183$) and *B. ovis* ($p < 0.002$), keeping this response high until day 135. After that, there is a decrease in the antibody titers (RB51 $p < 0.007$, *B. ovis* $p < 0.01$). On the other hand, the control group remains within negative ranges for the I-ELISA test. When using the antigens of RB51, it is determined that the use of the adjuvant in the second dose generates an increase in the antibody titers ($p < 0.018$) that is not observed with the antigens of *B. ovis* ($p > 0.117$). Comparing the antibody curves obtained when using the different antigens, higher values are obtained when using the *B. ovis* antigens than those of RB51, with the exception of the group in which the adjuvant was used ($p > 0.325$).

It is concluded that the use of two doses of the vaccine *Brucella abortus* strain RB51 generates a strong humoral immune response in rams, which is increased with the use of the adjuvant Montanide™ Gel in the booster. Likewise, there is a cross-immune reaction between the antigens of RB51 and *B. ovis*, which determines a diagnostic interference in the I-ELISA technique standardized in the study. On the other hand, future research is required to demonstrate the protective effectiveness of RB51 against *B. ovis*.

Keywords: *Brucella abortus* strain RB51, rams, I-ELISA, adjuvant

Funding Source: Project VT-UACH Joint Research Program Seed Grant: “Prevention of *Brucella ovis* induced pathology in rams through vaccination”

3. INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad bacteriana zoonótica producida por cocobacilos Gram negativos del género *Brucella*. Este género está constituido por diez especies, con predilección por diferentes hospedadores (Spink 1956), *B. abortus* (afectando principalmente a bovinos), *B. melitensis* (caprinos y ovinos), *B. suis* (porcinos), *B. neotomae* (rata del desierto), *B. canis* (caninos), *B. ovis* (ovinos), *B. ceti* (cetáceos), *B. pinnipedialis* (pinípedos), *B. microti* (topillo campesino) y *B. inopinata* (humano) (Corbel 1997, Foster y col 2007). Más recientemente, se describe la especie *B. papionis* en papiones (Whatmore y col 2014) y *B. vulpis* en zorros (Scholz y col 2016). De las especies descritas, sólo *B. ovis* y *B. neotomae* no evidencian un rol patógeno en el humano (Covert y col 2009, Pappas 2010), mientras que en el caso de *B. papionis* y *B. vulpis* aún no existen antecedentes relacionados a su patogenicidad en la especie humana.

La infección por *Brucella*, de amplia distribución mundial, provoca en animales alteraciones reproductivas, tales como abortos en el último tercio de la gestación, nacimiento de crías débiles, infertilidad y bajo rendimiento reproductivo en machos, lo que impacta en pérdidas económicas en la producción animal (Olsen y Bellaire 2013).

En Chile, *B. abortus* y *B. ovis* son las especies reconocidas de este género que afectan respectivamente al ganado bovino y ovino. Frente a *B. abortus*, dadas las alteraciones reproductivas y mermas económicas generadas en la producción bovina, junto a su potencial zoonótico, el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) mantiene un programa vigente de erradicación de brucelosis bovina por más de 30 años (inicio en 1975 en zona sur del país), que aplica para las zonas endémicas (Provincias de Arauco y Biobío de la Región del Biobío hasta la Región de Los Lagos), zonas de presentación esporádica (Región de Coquimbo hasta Provincias de Ñuble y Concepción) y zona extrema sur del país (Región de Magallanes, Región de Aysén y comunas de Chaitén, Fultaleufú y Palena en la Región de Los Lagos) actualmente considerada libre de brucelosis bovina en donde se realiza vigilancia sistemática de los rebaños. Los resultados de este programa en el año 2015 entregan una prevalencia predial nacional de 0,023%, pero se observa que la situación de la brucelosis bovina entre los años 2010 y 2015 se encuentra en un estancamiento al existir aún focos de enfermedad en regiones endémicas (SAG 2016). De manera más reciente, se declaran las regiones de Atacama y Coquimbo como erradicadas de brucelosis bovina y provisionalmente libres (SAG 2017).

En el caso de *Brucella ovis*, causante de la “Epididimitis Contagiosa del Carnero” en ovinos, enfermedad que no posee características zoonóticas, pero afecta la salud y exportación del ganado ovino en Chile (Quevedo 2007), principalmente en la zona Austral, lugar en el que se concentra la masa ganadera a nivel nacional. El agente, fue aislado por primera vez en Nueva Zelanda en el año 1952 a partir de ovejas abortadas, mientras que en el año 1953 se reporta la epididimitis en carneros de forma simultánea en Australia y Nueva Zelanda. En 1956 se describe por primera vez en América, ocurriendo en 1961 el primer reporte en Argentina (Robles 1998). En Chile, no existen reportes sobre el primer caso, pero Alegría aisló por primera vez al agente en 1968 en la provincia de Santiago (Zamora y col 1977). El cuadro se caracteriza por la manifestación de epididimitis en

los carneros, abortos infrecuentes y mortalidad perinatal aumentada. Se considera que la vía de transmisión preponderante es el contacto entre carneros por sodomía, más que por contacto con la hembra (OIE 2008).

El diagnóstico de la brucelosis en ovinos puede realizarse clínicamente mediante la palpación de los genitales externos del macho para la detección de la epididimitis, siendo una de las manifestaciones más frecuentes en los animales afectados, considerándose una técnica barata y sencilla. Sin embargo, es poco específica al producirse cuadros clínicos similares por acción de patógenos como *Actinobacillus seminis*, *Histophilus ovis*, *Corynebacterium* spp, etc (Robles 1998). A esto se le suma que sólo un 35% de los individuos infectados presentan lesiones detectables a la palpación (Ridler y West 2011). Por otra parte, se considera que el único método de diagnóstico definitivo es el aislamiento de la bacteria, pero en general este método se considera engorroso y de alto costo dada la cantidad de animales que son mantenidos en la mayoría de los planteles ovinos (Quevedo 2007). Debido a esto, se emplean frecuentemente técnicas diagnósticas indirectas que permiten la detección de anticuerpos en suero, como ocurre con el Enzimo Inmuno Ensayo (ELISA), la prueba de fijación del complemento (FC) y pruebas de difusión en gel. En general, estas pruebas son utilizadas para el diagnóstico, ya que entregan resultados en base a los niveles de anticuerpos basándose en una reacción química de interpretación rápida y sencilla (Ridler y West 2011). A nivel nacional, de acuerdo al programa de control establecido por el SAG, se utiliza una combinación del método clínico, ELISA y la prueba de fijación del complemento (SAG 2014).

El SAG implementó desde el año 2013 un Programa de Control Voluntario que otorga una certificación de predio libre de *Brucella ovis* a los productores que cumplan con los requisitos establecidos en el documento. Pero, al ser de carácter voluntario, no existen estadísticas que demuestren eficacia tras la aplicación de este programa a nivel nacional. Además, el programa carece de uno de los pilares fundamentales en el control de la brucelosis, que es la prevención mediante vacunación de los rebaños (SAG 2013^a).

En Europa, la infección por *B. ovis* se previene de manera exitosa utilizando la vacuna Rev.1, la cual es empleada para la infección por *B. melitensis* pero que también resulta efectiva contra *B. ovis*, considerándose la opción de elección para brindar profilaxis en pequeños rumiantes (Banai 2002). La vacuna Rev.1 corresponde a una cepa viva atenuada de *B. melitensis* que, a pesar de ser una cepa atenuada, conserva un grado de virulencia bajo para carneros y puede ocasionar abortos ocasionalmente al administrarse en hembras gestantes (Schurig y col 2002), además de significar un riesgo de infección humana ante la inoculación accidental (Ridler y West 2011). Sin embargo, debido que nuestro país se declara libre de *B. melitensis* ya que no existen reportes del agente desde el año 1987 (SAG 2013^b), sanitariamente no es posible la utilización de esta vacuna en el territorio nacional ni en países que sean considerados libres de este agente (Burgess 1982).

Es así como, a nivel nacional existe una carencia en los métodos para la prevención y control de la brucelosis ovina ocasionada por *B. ovis*, siendo la única alternativa el sacrificio de los animales afectados, sin existir maneras efectivas para la prevención de la enfermedad como en países en los que puede ser empleada la vacuna Rev.1 (Olsen y Bellaire 2013).

La vacuna viva *B. abortus* cepa 19 ha sido utilizada a nivel mundial para el control de la infección por *B. abortus* en bovinos, siendo una vacuna que es capaz de generar una respuesta inmune específica hacia la cadena “O” de lipopolisacáridos (LPS) en suero y leche, pero que genera interferencia diagnóstica. Esta cepa fue utilizada a nivel nacional por casi 20 años hasta el año 1997, donde se aprobó el uso de la vacuna *B. abortus* cepa RB51 (RB51), la que terminó por desplazar a la cepa 19 (Ramírez y col 2002). Por otra parte, la cepa RB51 es de tipo mutante rugosa, estable y resistente a rifampicina, derivada de la cepa virulenta 2308 de *B. abortus*, ha permitido entregar una inmunidad de rebaño frente a *B. abortus*, sin provocar interferencia diagnóstica. Al ser una cepa rugosa, a diferencia de las cepas lisas como *B. abortus*, posee en su pared celular LPS que carecen de la cadena “O” de azúcares, estructura responsable de la generación de una fuerte respuesta inmune humoral detectada por la mayoría de los métodos diagnósticos serológicos utilizados para brucelosis (Schurig y col 1991). Además, la inmunidad generada por la cepa RB51 es similar a la inducida por *B. abortus* cepa 19 tras un año de inoculación y presenta menor riesgo de inducción de abortos o placentitis en hembras gestantes que la cepa 19. La vacuna RB51 es utilizada actualmente en Estados Unidos de forma oficial, al igual que Colombia, México, Venezuela y Chile. En Argentina se emplea de forma voluntaria y con un permiso provisional (Ramírez y col 2002).

Existen antecedentes sobre el uso de la vacuna RB51 en múltiples especies además del bovino. En México, se demuestra que su uso es eficaz para el control de la brucelosis caprina por *B. melitensis* en una zona endémica de alta prevalencia (Martínez y col 2006), también reportándose excelentes resultados de protección frente a *B. suis* en porcinos en condiciones de campo, y posible inmunidad protectora frente a *B. melitensis* (Schurig y col 2002) que debe ser corroborada. Por otra parte, la vacuna ha sido utilizada en búfalos de agua (Caporale y col 2010) y en otras especies silvestres de manera experimental, tales como alces, bisontes, ciervos, coyotes y otros ungulados, con la finalidad de controlar la brucelosis endémica (Kreeger y col 2002).

En ovinos, en el año 1995 se utilizó la cepa RB51 en carnerillos para evaluar la generación de inmunidad protectora de RB51 contra *B. ovis*, concluyéndose que una única dosis de la vacuna no era efectiva para este fin (Jiménez y col 1995). Por otra parte, de manera similar, en el año 1997, la inoculación de la cepa en carnerillos en dos dosis más un posterior desafío con *B. ovis*, tampoco generó una respuesta protectora al no existir una diferencia entre los animales vacunados y los no vacunados (Pérez 1997). Sin embargo, se requieren de nuevas pruebas para obtener un resultado concluyente sobre la efectividad de esta vacuna en la especie ovina (Schurig y col 2002).

Dada la gran masa ovina existente a nivel de la zona Sur-Austral de Chile, el riesgo de exposición a *B. ovis* y la falta de medidas profilácticas vacunales, se desarrolló en forma conjunta con la Universidad Virginia Tech, USA y la Universidad Austral de Chile un proyecto denominado VT-UACH Joint Research Program Seed Grant: “Prevention of *Brucella ovis* induced pathology in rams through vaccination”, que buscó evaluar la posible presentación de patología testicular con la inoculación y la respuesta inmune humoral inducida por el uso de la cepa RB51 en carnerillos.

3.1. HIPÓTESIS

La vacunación con dos dosis de la cepa *B. abortus* RB51 induce una fuerte respuesta inmune humoral en carnerillos, pudiendo incrementarse al utilizar un adyuvante.

3.2. OBJETIVOS

3.2.1. Objetivo General

Determinar el nivel de anticuerpos en carnerillos frente a la inoculación de dos dosis de la vacuna *B. abortus* cepa RB51 y una dosis de la misma vacuna asociada a un adyuvante, utilizando como método diagnóstico la prueba de I-ELISA y evaluando además la reactividad cruzada con antígenos de *B. ovis*.

3.2.2. Objetivos Específicos

Elaborar antígenos de RB51 y *B. ovis* por el método de purificación de extracto salino para ser utilizados en las pruebas de I-ELISA.

Cuantificar la respuesta inmune humoral generada tras la vacunación de carnerillos con la vacuna *B. abortus* cepa RB51 asociada o no a adyuvante mediante I-ELISA a distintos tiempos previo y posterior a la vacunación, empleando antígenos de RB51 y *B. ovis*.

Comparar la respuesta inmune humoral frente a antígenos de RB51 y *B. ovis* para distintos grupos de vacunación con la vacuna *B. abortus* cepa RB51 en carnerillos.

Determinar mediante I-ELISA la presencia y respuesta inmune cruzada entre antígeno de RB51 y *B. ovis* en los sueros de los carnerillos vacunados.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. Muestras de Suero

Se trabajó con un banco de 304 sueros recolectados a partir de un muestreo seriado de 19 carnerillos que forman parte del proyecto VT-UACH 2016-2017 “A Virginia Tech – University Austral Research Team Building Project: Prevention of *Brucella ovis* induced Pathology in Rams through Vaccination”, en el que se busca evaluar en ovinos machos a partir de los 6 meses de edad la respuesta inmune humoral y la ausencia de lesiones testiculares y epididimarias al examen clínico tras la vacunación experimental con la cepa vaccinal *B. abortus* RB51.

Los animales de razas Frisona Milchschaft y cruce Border x Texel, provenientes de dos rebaños ovinos de las Comunas de Mariquina y Futrono de la Región de Los Ríos, fueron previamente sometidos a un ELISA comercial en el Laboratorio Survet en Osorno para corroborar su estatus serológico frente a *B. ovis* (Anexo 1). Estos animales fueron mantenidos durante el período del estudio en las dependencias del Hospital Veterinario de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Austral de Chile. Estos fueron divididos aleatoriamente en dos grupos de 6 (grupo 1 y 2) y uno de 7 animales (grupo 3), identificados y distribuidos en tres corrales separados en el área de rumiantes.

El grupo 1 o grupo control fue inoculado el día 0 con una dosis de 2 ml entre diluyente de la vacuna y adyuvante Montanide™ Gel 01 ST, Laboratorio Seppic S.A. proporcionado por el Dr. G. Schurig y Dr. M. Sriganganathan, Universidad de Virginia Tech- Maryland, USA. Los grupos 2 y 3 recibieron el mismo día, una dosis de 2 ml de la vacuna RB51 a la concentración $10\text{-}34 \times 10^9$ UFC. Al tercer mes post primera dosis o día 90, los grupos 1 y 2 recibieron el mismo tratamiento anterior, mientras que el grupo 3 una dosis de 2 ml que contiene vacuna + adyuvante.

Las muestras de sangre para obtención de suero sanguíneo fueron recolectadas y etiquetadas por cada animal durante todo el estudio (6 meses) en los siguientes tiempos:

- a) Previo a la vacunación
- b) Día 3, 7 y 15 post vacunación y cada 15 días hasta los 3 meses
- c) Día 3, 7, 15 post segunda dosis y cada 15 días hasta los 3 meses

Posterior a la obtención de la sangre por veno-punción yugular, las muestras fueron inmediatamente trasladadas al Instituto de Bioquímica y Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Austral de Chile, luego de la formación del coágulo fueron centrifugadas, obteniéndose alícuotas de suero que fueron dispuestas en duplicado en tubos eppendorf para su almacenamiento bajo congelación en el laboratorio de Brucelosis del mismo Instituto. El almacenamiento de sueros fue realizado durante el período de toma de muestras del estudio hasta su posterior análisis en laboratorio (Fuentealba 2017).

4.1.2. Reactivos biológicos

Antígenos

1. Antígeno RB51: Obtenido a partir de la cepa vaccinal N° de Serie 3003 Dil 4369.
2. Antígeno *B. ovis*: Obtenido a partir de la cepa ATCC® 25840 de *B. ovis*.
3. Vacuna comercial cepa *B. abortus* RB51: N° de Serie 3003 Dil 4369.

Anticuerpos

1. Anticuerpo conjugado: Anticuerpo de burro anti-inmunoglobulina ovina marcado con peroxidasa Sigma Aldrich®.

4.1.3. Reactivos químicos, materiales y equipos de laboratorio:

1. Buffers de Adsorción, Bloqueo, Lavado.
2. TMB Thermo Fisher Scientific®
3. Micropipetas de precisión
4. Kit de concentración de proteínas Pierce BCA Protein Assay Kit-Thermo Fisher Scientific®
5. Placas poliestireno de 96 pocillos Nunc
6. Espectrofotómetro Tecan® NanoQuant Infinite® M200
7. Material fungible de laboratorio

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Obtención de antígenos por el método de purificación de extracto salino

Para la realización de las pruebas de ELISA, la obtención de los antígenos de RB51 se realizó en el Instituto de Bioquímica y Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Austral de Chile y los de *B. ovis* en uno de los laboratorios del “Center for Molecular Medicine and Infectious Diseases” de la Universidad de Virginia Tech-Maryland, USA, mediante el protocolo de purificación de extracto salino (HSE) de antígenos (Alton y col 1988; Gamazo y col 1989).

Para ello, se realizó el cultivo de la cepa vaccinal comercial RB51 y de la cepa comercial ATCC® 25840 de *B. ovis* mediante el mismo protocolo en 10 placas de agar sangre por 48 horas a 37°C. Tras la incubación, se adicionaron 5 ml de PBS en cada placa para la suspensión de las colonias, se recolectó el PBS y se centrifugó a 2500 rpm. El sobrenadante fue descartado y las células fueron resuspendidas en una razón de 1:10 con PBS, repitiendo este procedimiento dos veces. La suspensión resultante fue autoclavada a 120°C durante 20 minutos y centrifugada posteriormente a 2500 rpm durante 40 minutos. Se descartó el precipitado y el sobrenadante fue esterilizado mediante filtración, siendo posteriormente dializado con agua destilada por un período de 48 horas.

La concentración de antígenos obtenida fue determinada empleando un kit comercial de determinación de concentración de proteínas.

Los antígenos de RB51 fueron alicuotados para su uso posterior, mientras que los de *B. ovis* fueron liofilizados y enviados a Chile por vía aérea, para posteriormente ser reconstituídos y alicuotados para su utilización en los ELISA.

4.2.2. I-ELISA

Para verificar la respuesta inmune humoral de los sueros ovinos de los 3 grupos analizados se utilizó un I-ELISA que mide la respuesta de anticuerpos frente a antígenos de RB51 y *B. ovis*. Cada pocillo de las microplacas de poliestireno Nunc (96 pocillos) fue incubado con 1 µg de antígeno purificado de RB51 o *B. ovis* contenido en 100 µl de buffer carbonato 0,1 M, pH 9,6 por 18 horas a 4°C para su posterior utilización. Se adsorbieron todas las placas a utilizar y fueron mantenidas bajo congelación hasta su uso. El contenido no adsorbido fue eliminado por inversión de la microplaca para luego bloquear los espacios no adsorbidos con buffer de bloqueo elaborado con PBS-leche descremada 5%. Posteriormente se realizó un ciclo de 3 lavados con PBS pH 7,2 más Tween® 20 en volumen aproximado de 200 µl por pocillo. Posterior a ello, se dispusieron sueros problema y sueros controles en duplicado, diluidos a razón de 1:50 en PBS-leche descremada 0,5% pH 7,2 y en una cantidad de 100 µl por pocillo por un período de incubación de 60 minutos a 37°C, finalizando con un ciclo de lavado con PBS-Tween® 20. Como sistema de detección, se adicionaron 100 µl del anticuerpo conjugado con peroxidasa anti-inmunoglobulina ovina (elaborado en burro) diluido en una solución de PBS pH 7,2 en concentraciones de 1:5000, para ser incubada 60 minutos a 37°C. Finalmente, luego de un nuevo ciclo de lavado, se agregó por pocillo 100 µl de una solución reveladora TMB más peróxido de hidrógeno y se incubó a 37°C por 10 minutos en oscuridad, permitiendo el desarrollo de color. La lectura de las densidades ópticas de cada pocillo se efectuó en el equipo NanoQuant Infinite® M200 a 370nm, entregando los resultados por cada placa en Microsoft® Excel® 2013.

La estandarización del ELISA fue realizada utilizando concentraciones variables de antígeno y conjugado hasta llegar a las densidades ópticas (D.O.) lo más cercanas a 1 para el control positivo y lo más cercanas a 0 para el control negativo. Para ello, se testearon distintas cantidades de antígeno en las placas (0,5 ug, 1 ug y 1,5 ug) y diluciones de 1:50, 1:100 y 1:150 del suero problema mientras que del conjugado se emplearon diluciones de 1:4000, 1:5000 y 1:6000, aplicando el método de la titulación en tablero de ajedrez (Fields y col 1983).

Como control positivo se empleó una muestra de suero de un carnero infectado con *B. ovis*, confirmado con cultivo y con un ELISA comercial y para el control negativo un suero ovino testado previamente con un ELISA comercial.

4.2.3. Análisis de datos

La estandarización de los resultados fue realizada mediante la elaboración de una curva en Microsoft® Excel® para discernir entre reacciones positivas y negativas entre el antígeno y las muestras de suero.

Los resultados fueron analizados utilizando el programa Microsoft® Excel®, el software Estadístico SAS® Proprietary Software (TS1M2) y el software Estadístico R commander (Rcmdr) versión 3.4.1. para Windows. Los datos se expresan en medias de las densidades ópticas (D.O.) de cada grupo y de cada individuo obtenidas al ELISA. La significancia de las diferencias en las concentraciones de anticuerpos y su magnitud de cambio fue evaluada mediante un análisis de varianzas de medidas repetidas, determinando la significancia estadística con un valor $p < 0,05$. Además, se realizan las pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk y el test Tukey para la comparación de los distintos grupos.

5. RESULTADOS

5.1. OBTENCIÓN DE ANTÍGENOS Y ESTANDARIZACIÓN DEL I-ELISA

Se obtuvo una concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de extracto antigénico de RB51 y de 375 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de antígenos de *B. ovis*.

En la metodología de estandarización por tablero de ajedrez de la prueba de I-ELISA, se escogieron las siguientes concentraciones de trabajo: 1 $\mu\text{g}/\text{pocillo}$ de antígeno RB51 o *B. ovis* para la etapa de adsorción, diluciones de 1:50 para sueros ovinos en controles y muestras, y dilución de 1:5000 para anticuerpo conjugado en la etapa de detección del complejo inmune. Su aplicación determinó la obtención de valores de D.O. 1 para control positivo, valor de 0,1 a 0,3 y 0,2 a 0,4 para los controles negativos de antígeno RB51 y *B. ovis* respectivamente, y un valor de 0,1 o inferior para el control de conjugado para ambos antígenos.

5.2. PRESENCIA DE ANTICUERPOS ANTI-RB51

Durante los 30 días posteriores a la primera dosis de la vacuna efectuada el día “0”, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre grupo control (grupo 1) y los grupos vacunados (grupo 2 y 3) ($p > 0,05$). Sin embargo, a partir del día 45 hasta el día 93 se observa una leve alza en la cantidad de anticuerpos (expresada en D.O.) para los grupos 2 y 3 ($p < 0,02$). Al día 97, es decir, 7 días posterior a la segunda dosis vaccinal o booster, los grupos 2 y 3 presentan un notorio incremento en la tasa de anticuerpos, siendo más elevada para el grupo 3 ($p < 0,018$). Al día 135 comienza a detectarse una disminución de las D.O. del promedio de los grupos ($p < 0,007$) que persiste hasta el último muestreo el día 180 (Figura 1). Se adjunta en anexos (Anexo 4) los valores promedio empleados para la elaboración de la curva de anticuerpos.

Cabe destacar que las D.O. promedio del grupo 1 se mantienen dentro del rango establecido como negativo para la prueba durante todo el período de muestreo (Figura 1).

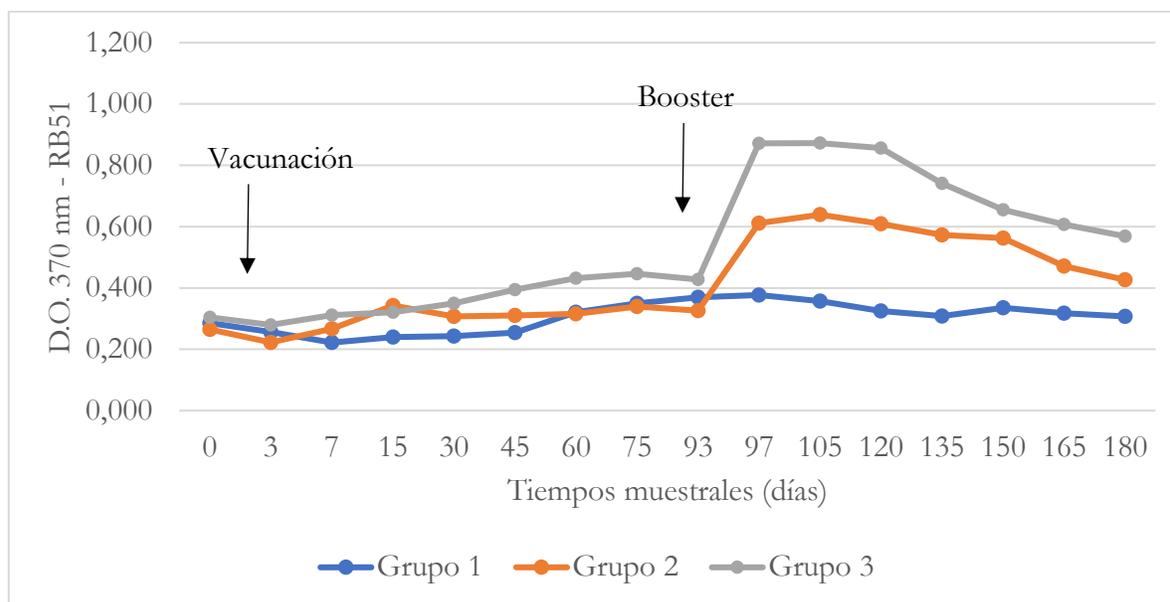


Figura 1. Niveles promedio de anticuerpos anti-RB51 (expresados en D.O.) obtenidos durante 180 días en el grupo control o grupo 1, el grupo 2 inyectado dos veces con la vacuna RB51 y el grupo 3 al cual se administró la segunda dosis vaccinal con adyuvante.

A nivel individual (Figura 2) destaca la respuesta humoral de los carnerillos 25 y 27 del grupo 2, en donde el primero a lo largo de todo el período de estudio presenta una elevada respuesta de anticuerpos en relación a los carnerillos de su grupo, alcanzando un valor D.O. máximo de 0,953. El segundo, por el contrario, mantiene durante todo el período niveles de D.O. considerados negativos para la prueba. Por otra parte, los grupos 1 y 3 presentan valores más homogéneos a lo largo de los muestreos (Anexo 2).

El análisis estadístico determinó que los valores residuales de los datos presentaron una distribución normal al realizar el test de Shapiro-Wilk ($p > 0,276$), por lo que fue posible aplicar los análisis de varianzas de medidas repetidas mediante un modelo mixto. Es así como se realizó la prueba estadística de Tukey para la comparación entre grupos durante el desarrollo del estudio.

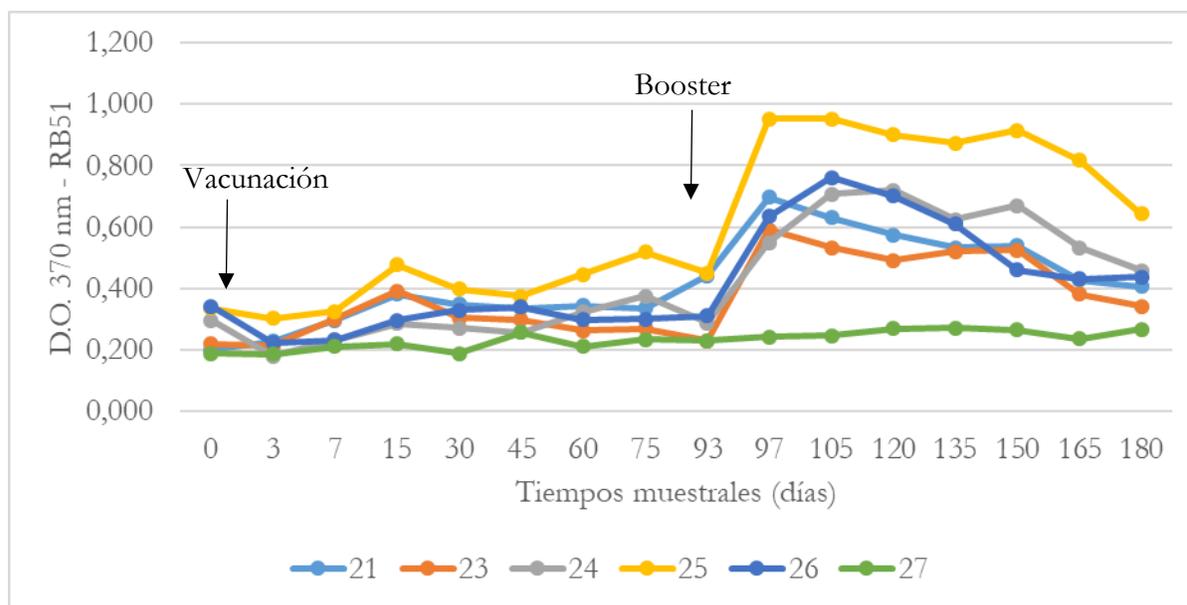


Figura 2. Niveles promedio por individuo de anticuerpos anti-RB51 (expresados en D.O.) obtenidos durante 180 días en los carnerillos del grupo 2 inyectados dos veces con la vacuna RB51.

5.3. PRESENCIA DE ANTICUERPOS ANTI-*B. ovis*

Durante los 15 días posteriores a la primera dosis de la vacuna, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre grupo control (grupo 1) y los grupos vacunados (grupo 2 y 3) ($p > 0,59$). A partir del día 30 post-vacunación hasta el día 93 se observa un alza en la cantidad de anticuerpos (expresada en D.O.) para los grupos 2 y 3 ($p < 0,001$). Al día 7 post segunda vacunación (día 97), los grupos 2 y 3 presentan un notorio incremento en la tasa de anticuerpos ($p < 0,002$) en relación al grupo control, sin embargo, entre ellos no existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,117$). Esta alza se mantiene hasta el día 135, momento en que ocurre una disminución en las D.O. promedio de ambos grupos vacunados ($p < 0,01$) que persiste hasta el último muestreo el día 180 (Figura 3). Se adjunta en anexos (Anexo 5) los valores promedio empleados para la elaboración de la curva de anticuerpos.

El análisis estadístico, determinó que tanto los valores originales y residuales de los datos tienen una distribución de tipo normal (Shapiro-Wilk, $p > 0,1944$ y $p > 0,3551$ respectivamente), frente a ello, se aplicó el análisis de varianzas de medidas repetidas. La prueba estadística de Tukey fue empleada para la comparación de los tres grupos.

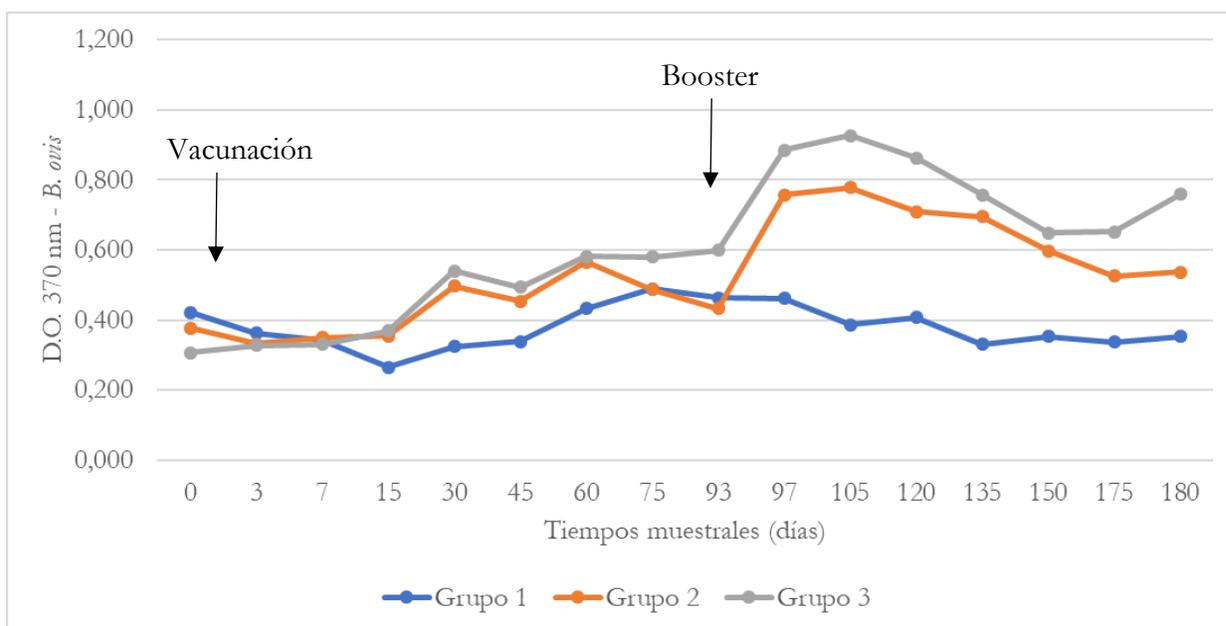


Figura 3. Niveles promedio de anticuerpos anti-*B. ovis* (expresados en D.O.) obtenidos durante 180 días en el grupo control o grupo 1, el grupo 2 inyectado dos veces con la vacuna RB51 y el grupo 3 al cual se administró la segunda dosis vaccinal con adyuvante.

A nivel individual, para I-ELISA *B. ovis* destacan los resultados obtenidos para los carnerillos 25 y 27, donde el primero presenta un aumento destacado de la D.O. en comparación al resto del grupo, alcanzando un valor de 1,177 al día 97 (Figura 4) y el segundo presenta títulos de anticuerpos menores en comparación al resto del grupo, no existiendo incremento en la D.O. en el día 97 como se observa para los demás carnerillos. Por otra parte, los grupos 1 y 3 presentan valores más homogéneos a lo largo de los muestreos (Anexo 3).

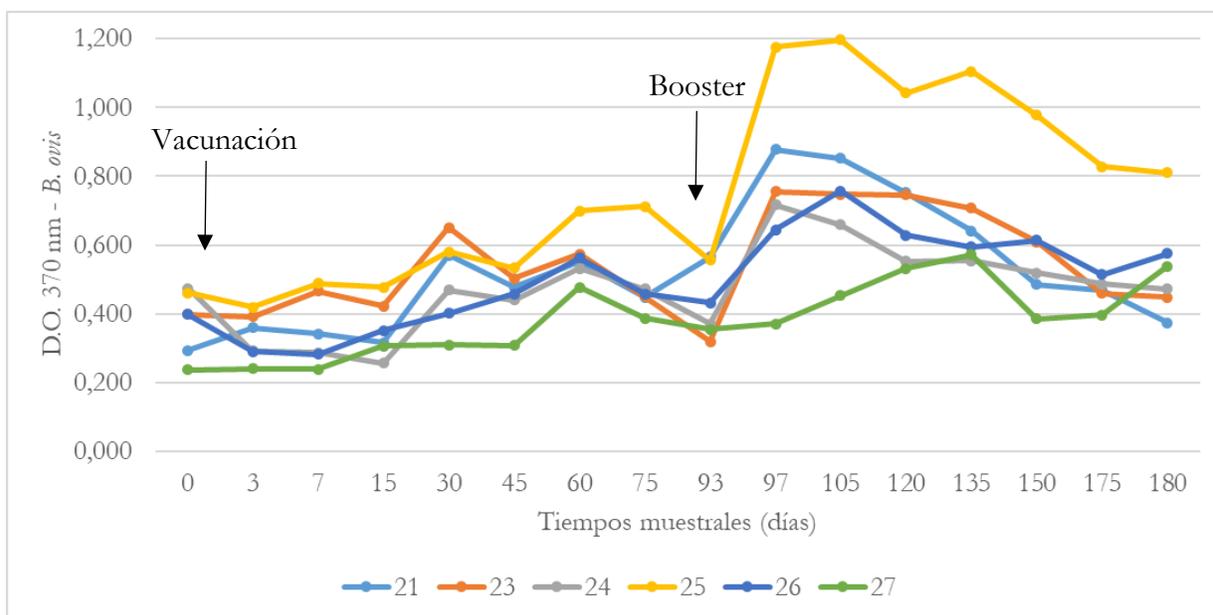


Figura 4. Niveles promedio por individuo de anticuerpos anti-RB51 (expresados en D.O.) obtenidos durante 180 días en los carnerillos del grupo 2 inyectados dos veces con la vacuna RB51.

5.4. COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS FRENTE A ANTÍGENOS DE RB51 Y *B. ovis*

Comparando las curvas D.O. promedio de cada grupo, se observa que los niveles de anticuerpos frente a antígeno de *B. ovis* resultan más elevados que los niveles alcanzados frente a antígenos de RB51 frente a los protocolos de vacunación utilizados. Esto queda demostrado al realizar un análisis de varianza, donde se determinó que existen diferencias estadísticamente significativas para los grupos 1 ($p < 0,0006$) y 2 ($p < 0,003$) con el uso de los distintos antígenos.

En el grupo 3 se observa que sólo existen diferencias estadísticamente significativas entre las respuestas a ambos antígenos entre los días 15 y 93 del estudio ($p < 0,08$) no existiendo diferencias en el resto del período ($p > 0,325$).

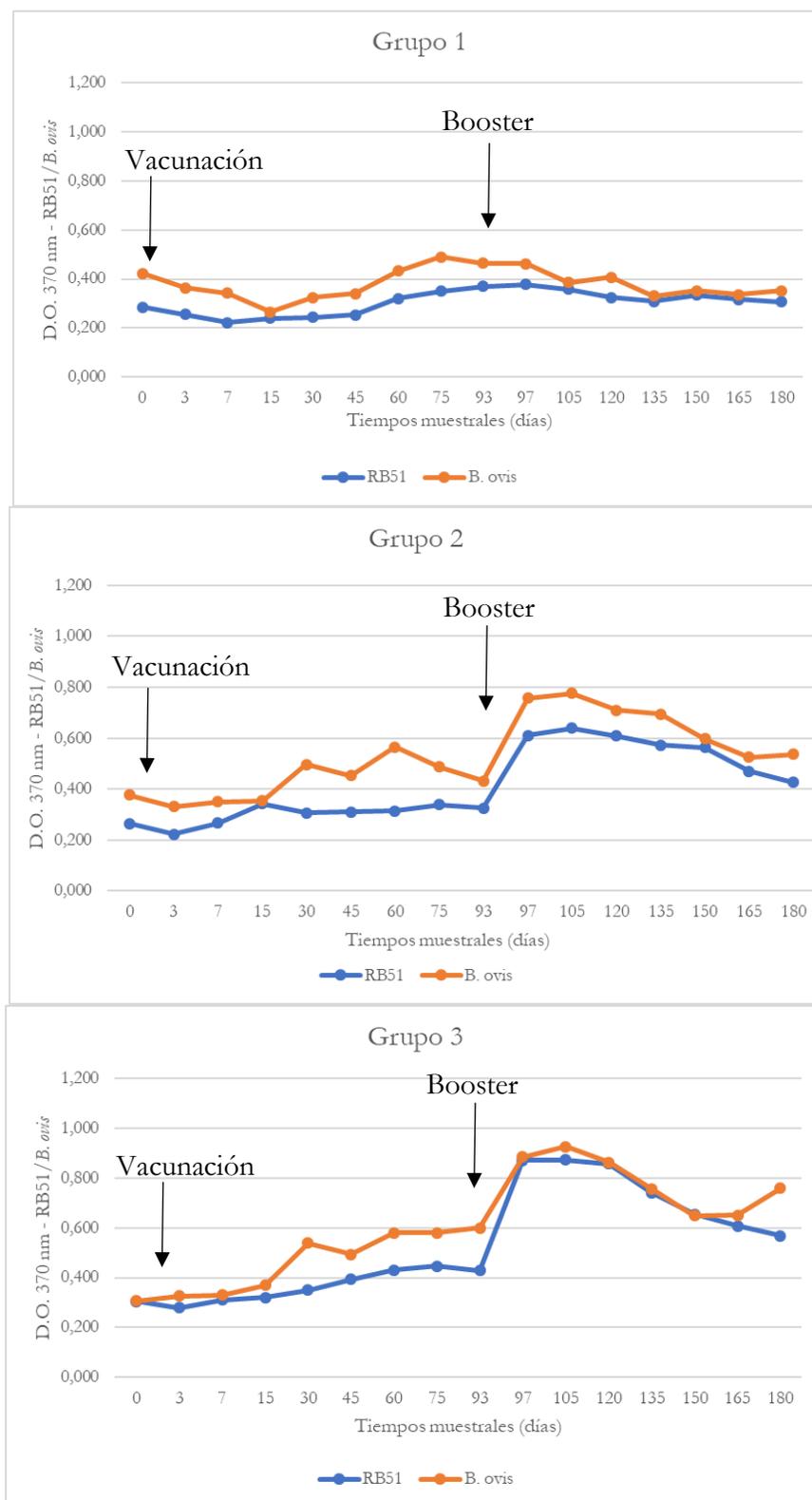


Figura 5. Comparación de los niveles promedio de anticuerpos (expresados en D.O.) anti-RB51 y *B. ovis* obtenido por I-ELISA para cada grupo de carnerillos.

6. DISCUSIÓN

La obtención de distintos antígenos de *Brucella* y su utilización en inmunoensayos (ELISA, Fijación del complemento, Inmunoblot, etc) permite conocer el estatus serológico de un animal frente a la infección o evaluar la respuesta humoral por curvas de títulos de anticuerpos basadas en muestreos seriados. Esto último puede ser aplicado para evaluar la respuesta humoral estimulada por una vacuna.

En nuestro estudio, utilizando extracto salino de RB51 y extracto salino de *B. ovis*, observamos altos títulos de anticuerpos frente a ambos antígenos, siendo mayores frente a *B. ovis*, lo cual se contrapone con lo descrito por Adone y Ciuchini en el año 2011. Esto podría deberse a diferencias en el protocolo utilizado para la obtención de antígenos, la pureza de éste mismo, así como la cepa de *B. ovis* empleada para la extracción. También influyen las condiciones de estandarización del ELISA de cada laboratorio, ejemplo de ello es que, al comparar los resultados del ELISA *B. ovis* implementado en este estudio con el ELISA comercial *B. ovis* utilizado para chequear el ingreso de todos los animales con serología negativa previo la vacunación, nuestro ELISA genera D.O. significativamente más elevadas que el ELISA comercial (Anexo 1). Esto podría ser causado por el antígeno empleado, probablemente más específico en el Kit comercial que nuestro extracto salino, el cual posee gran cantidad de proteínas y otros compuestos de *Brucella*, tales como parte de LPS, proteínas y algunos polisacáridos (Suárez y col 1988) o bien las diluciones de muestra o conjugado aplicadas. En el estudio realizado por Adone y Ciuchini, se emplearon antígenos de *B. abortus* RB51 para identificar por fijación del complemento a carnerillos vacunados con esta cepa, de igual forma utilizaron antígenos de *B. ovis* determinando que los títulos de anticuerpos en los animales vacunados con RB51 son elevados frente a ambos antígenos y mayores para antígenos de RB51.

El esquema de vacunación utilizado en esta oportunidad, con un booster a los 90 días manteniendo la dosis vaccinal inicial en ambas dosis ($10^{-34} \times 10^9$ UFC), permitió estimular una fuerte respuesta de anticuerpos la que, fue significativamente mayor cuando se incorporó el adyuvante Montanide™ Gel. Los adyuvantes son compuestos que se asocian a las vacunas con la finalidad de incrementar la respuesta inmune innata, exacerbando la respuesta inflamatoria ante un inóculo para dar una mayor llegada de células presentadoras de antígenos a la zona, generando así un aumento de la respuesta inmune adaptativa (Di Pasquale y col 2015). Esto es un factor importante para considerar, ya que no existen precedentes de la utilización de adyuvantes junto a la vacuna RB51 en carnerillos, lo cual implica que el tipo de respuesta generada por los animales podría ir más allá de la respuesta inmune de tipo humoral.

En el año 1995, Jiménez y colaboradores, vacunaron ovinos con RB51 (dosis $4,18 \times 10^{10}$) determinando que una sola dosis de la vacuna no era protectora en los carnerillos frente al desafío con *B. ovis*, haciendo que el uso de esta vacuna no fuera recomendable en esta especie. Si bien en nuestro estudio no se realizó desafío, se corrobora que una única dosis no generó cambios significativos en las D.O. de los sueros de los carnerillos vacunados. Más tarde, Pérez en 1997, concluye que la cepa RB51 no entrega protección a carnerillos vacunados y desafiados contra *B. ovis* pese a que su esquema incorporó un booster a los 14 o a los 20 días comparando dos grupos de

vacunación, iniciando con una dosis de 10×10^9 UFC que redujo a $4,5 \times 10^9$ UFC en la segunda dosis. Hemos visto como en la especie ovina una única dosis de la vacuna no genera el efecto humoral deseado, estimulando un leve aumento de los títulos de anticuerpos al día 45 post vacunación (Figura 1). En la especie bovina, en tanto, se genera una respuesta humoral que es posible de detectar mediante inmunoensayos, incluido el ELISA, a partir del día 30 post vacunación con una única dosis y que se mantiene detectable hasta los 360 días post vacunación, al emplear antígenos de RB51 (Rojas 2005), por lo que la revacunación estaría enfocada a incrementar la respuesta inmune previo al encaste en la especie bovina.

En carnerillos, la revacunación es crucial para el estímulo de un alto nivel de anticuerpos, contrastándose esta situación con lo que ocurre en la especie bovina, donde una única dosis es capaz de generar altos títulos de anticuerpos. Con una única dosis de la vacuna, los anticuerpos se mantienen elevados por un período de 38 días para luego comenzar a declinar. Por el contrario, Adone y Ciuchini (2011) observaron títulos por más de 15 semanas tras la segunda revacunación en ovinos, por lo que es necesario emplear boosters para mantener títulos de anticuerpos en niveles adecuados. La reactividad cruzada observada entre RB51 y *B. ovis* fue corroborada por este estudio, con curvas de anticuerpos con distribuciones similares (Figura 4) pero, de mayor magnitud al utilizar los antígenos de *B. ovis*. Esta respuesta cruzada de anticuerpos se relaciona con la naturaleza rugosa de ambas cepas y presencia de LPS-R (Adone y Ciuchini 2011; Saadi 2014). Todos estos antecedentes respaldan lo observado en 1994 por Jiménez y colaboradores que demostraron, en roedores, que la vacunación con la cepa RB51 podía otorgar protección contra *B. ovis*.

La especificidad de los antígenos utilizados en Inmuno Ensayos determina la presencia de reacciones cruzadas, que resultan benéficas para los animales, pero a su vez, resultan un potencial problema de interferencia diagnóstica, ya que no hay clara distinción entre los anticuerpos que reaccionan a antígenos de RB51 y *B. ovis* como ocurrió en los ELISA desarrollados en el estudio. Por ende, los ovinos vacunados e infectados son indistinguibles entre sí, con lo que el posible uso de esta vacuna en ovinos deberá ser acompañado con una nueva propuesta de diagnóstico para identificar a los animales infectados.

Por otra parte, el adyuvante Montanide™ Gel pareciera no realzar la respuesta cruzada de anticuerpos frente a *B. ovis* a diferencia de lo que ocurre frente a RB51 post segunda dosis vaccinal (Figura 5), por lo que habría que estudiar si este mismo efecto ocurriría vacunando con adyuvante en ambas dosis.

Finalmente, se describe que, dentro de las poblaciones de animales vacunados, existen individuos que no presentan una respuesta inmune adecuada posterior a la inoculación de una vacuna, así como puede darse el efecto contrario con individuos que generan una respuesta de anticuerpos más elevada que el promedio (Tizard 2013). Esto explicaría lo sucedido con el carnerillo 27 como ejemplo de anergia y con el carnerillo 25 como ejemplo de un animal buen respondedor.

A pesar de los resultados obtenidos, se requiere de futuras investigaciones para demostrar la efectividad protectora de la cepa RB51 frente a *B. ovis*.

6.1. CONCLUSIONES

La vacunación en carnerillos con dos dosis de la cepa RB51 genera una fuerte respuesta inmune humoral.

La utilización del adyuvante Montanide™ Gel incrementa significativamente el nivel de respuesta inmune humoral en los animales vacunados con la cepa RB51.

Existe una respuesta inmune cruzada entre los antígenos de RB51 y *B. ovis*, determinando una posible interferencia diagnóstica.

7. REFERENCIAS

- Adone R, Ciuchini F. 2011. *Brucella abortus* RB51 and hot saline extract from *Brucella ovis* as antigens in a complement fixation test used to detect sheep vaccinated with *Brucella abortus* RB51. *Clin Diagn Lab Immunol* 8, 119-122.
- Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. 1988. 1988. *Techniques for the brucellosis laboratory*. INRA, Paris, France.
- Banai M. 2002. Control of small ruminant brucellosis by use of *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine: laboratory aspects and field observations. *Vet Microbiol* 90, 497-519.
- Burgess GW. 1982. Ovine contagious epididimitis: a review. *Vet Microbiol* 7, 551-575.
- Caporale V, Bonfini B, Di Giannatale E, Di Provvido A, Forcella S, Giovannini A, Tittarelli M, Scacchia M. 2010. Efficacy of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 compared to the reference vaccine *Brucella abortus* strain 19 in water buffalo. *Vet Ital* 46, 13-19.
- Corbel MJ. 1997. Brucellosis: an overview. *Emerg Infec Dis* 3, 213-221.
- Covert J, Mathison A, Eskra L, Banai M, Splitter G. 2009. *Brucella melitensis*, *B. neotomae* and *B. ovis* elicit common and distinctive macrophage defense transcriptional responses. *Exp Biol Med* 234, 1450-1467.
- Di Pasquale A, Preiss S, Tavares F, Garçon N. 2015. Vaccine adjuvants: from 1920 to 2015 and beyond. *Vaccines* 3, 320-343.
- Fields HA, Davis CL, Bradley DW, Maynard JE. 1983. Experimental conditions affecting the sensitivity of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of hepatitis B surface antigen (HBsAg). *Bull World Health Organ* 61, 135-142.
- Foster G, Osterman B, Godfroid J, Jacques I, Cloeckert A. 2007. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 2688-2693.
- Fuentealba R. 2017. Evaluación andrológica de carnerillos vacunados con *Brucella abortus* cepa RB51. *Memoria de título*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Gamazo C, Winter AJ, Moriyón I, Riezu-Boj JI, Blasco JM, Díaz R. 1989. Comparative analyses of proteins extracted by hot saline or released spontaneously into outer membrane blebs from field strains of *Brucella ovis* and *Brucella melitensis*. *Infect Immun* 57, 1419-1426.
- Jimenez MP, Elzer PH, Jones SM, Blasco JM, Enright FM, Schurig GG, Winter AJ. 1994. 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, 4990-4996.

- Jiménez MP, Barberán M, Marín CM, Blasco JM. 1995. The *Brucella abortus* RB51 vaccine does not confer protection against *Brucella ovis* in rams. *Vaccine* 13, 301-304.
- Kreeger TJ, DeLiberto TJ, Olsen SC, Edwards WH, Cook WE. 2002. Safety of *Brucella abortus* strain RB51 vaccine in non-target ungulates and coyotes. *J Wildl Dis* 38, 552-557.
- Martínez HD, Barojas JL, Molina SB, Rodríguez CM, Abeledo GM, Alpiéz MM, Franco ZJ, Flores CR, Barradas PF. 2006. Field experiences with RB51 *Brucella abortus* vaccine in goats from Tenextepec, Veracruz, Mexico. Proceedings of the 11th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics.
- OIE, Organización Mundial de Sanidad Animal. 2008. Manual de la OIE sobre animales terrestres: Epididimitis ovina (*Brucella ovis*).
- Olsen S, Bellaire B. 2013. Brucella. In: McVey S, M Kennedy y MM Chengappa (eds). *Veterinary Microbiology*. 3rd ed. Wiley-Blackwell, Iowa, USA, Pp 127-133.
- Pappas G. 2010. The changing *Brucella* ecology: novel reservoirs, new threats. *Int J Antimicrob Agents* 36, 8-11.
- Pérez SA. 1997. Evaluación de la protección conferida a carnerillos inmunizados con cepa RB51, frente a una infección experimental con *Brucella ovis*. *Memoria de Título*. Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Quevedo MI. 2007. Epididimitis del Carnero (*Brucella ovis*): diagnóstico comparativo entre inmunodifusión doble en gel de agar y contraelectroforesis. *Memoria de Título*. Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Ramírez M, Ernst S, Elvinger F, Rivera A, Rosenfeld C. 2002. Respuesta serológica y tiempo de saneamiento en rebaños bovinos con brucelosis vacunados con Cepa 19 o Cepa RB-51; X^a Región, Chile. *Arch Med Vet* 34, 213-220.
- Ridler AL, West DM. 2011. Control of *Brucella ovis* infection in sheep. *Vet Clin Food Anim* 27, 61-66.
- Robles CA. 1998. Epididimitis contagiosa de los carneros por *Brucella ovis*. *Rev Med Vet (B aires)* 79, 67-75.
- Rojas CA. 2005. Caracterización de la respuesta inmune de bovinos frente a la vacunación con *Brucella abortus* cepa RB51. *Memoria de Título*. Escuela de Ciencias Veterinarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Saadí KT. 2014. Validación de un ELISA indirecto con antígeno citosólico de *Brucella abortus*. *Memoria de Título*. Escuela de Ciencias Veterinarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- SAG, Servicio Agrícola y Ganadero, Chile. 2013^a. Resolución N°812 Exenta del 8 de febrero de 2013.
- SAG, Servicio Agrícola y Ganadero, Chile. 2013^b. Resolución N°498 Exenta del 23 de enero de 2013.
- SAG, Servicio Agrícola y Ganadero, Chile. 2014. Certificación oficial de predios o plantales libres de Brucelosis ovina (*Brucella ovis*).

- SAG, Servicio Agrícola y Ganadero, Chile. 2016. Resultados del Programa Nacional de Erradicación de Brucelosis Bovina año 2015, marzo 2016.
- SAG, Servicio Agrícola y Ganadero, Chile. 2017. Resolución N°6.840 Exenta del 11 de noviembre de 2017.
- Scholz HC, Revilla-Fernández S, Al Dahouk S, Hammerl JA, Zygmunt MS, Cloeckaert A, Koylass M, Whatmore AM, Blom J, Vergnaud G, Witte A, Aistleitner K, Hofer E. 2016. *Brucella vulpis* sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*). *Int J Syst Evol Microbiol* 66, 2090-2098.
- Schurig GG, Boop II RM, Bagchi T, Boyle S, Buhrman D, Sriranganathan N. 1991. Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet Microbiol* 28, 171-188.
- Schurig GG, Sriranganathan N, Corbel MJ. 2002. Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet Microbiol* 90, 479-496.
- Spink W. 1956. *The nature of brucellosis*. University of Minnesota Press, Minnesota, USA.
- Suárez CE, Pacheco GA, Vigliocco AM. 1988. Characterization of *Brucella ovis* surface antigens. *Vet Microbiol* 18, 349-356.
- Tizard I. 2013 (ed). *Veterinary Immunology*. 9th ed. Saunders, St Louis, Missouri. The Use of Vaccines Pp 272-282.
- Whatmore MA, Davidson N, Cloeckaert A, Dahouk SA, Zygmunt MS, Brew SD, Perret LL, Koylass MS, Vergnaud G, Quance C, Scholz HC, Dick Jr EJ, Hubbard G, Schabritz-Loutsevitch NE. 2014. *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). *Int J Syst Evol Microbiol* 64, 4120-4128.
- Zamora J, Chahuán E, Polette M, Alonso O, Rojas X, Kruze J, Hervé M. 1977. *Brucella ovis* y otros agentes etiológicos en Epididimitis y Orquitis Infecciosa Ovina. *Arch Med Vet* 9, 94-99.

8. ANEXOS

8.1. ANEXO 1: RESULTADO ELISA INDIRECTO COMERCIAL PARA *B. ovis*

Carnerillo	Resultado	Interpretación
11	0,085	Negativo
12	0,038	Negativo
13	0,042	Negativo
14	0,043	Negativo
15	0,045	Negativo
16*	0,508	Sospechoso
17	0,078	Negativo
21	0,042	Negativo
22*	0,041	Negativo
23	0,036	Negativo
24	0,046	Negativo
25	0,059	Negativo
26	0,044	Negativo
27	0,066	Negativo
31	0,042	Negativo
32	0,048	Negativo
33	0,047	Negativo
34	0,037	Negativo
35	0,044	Negativo
36	0,061	Negativo
37	0,045	Negativo

Interpretación absorbancia:

- <0,460 = negativo
- 0,460-0,563 = sospechoso
- >0,563 = positivo.

*Carnerillo 16 y 22. El primero, resultó “sospechoso” al ELISA comercial *B. ovis*, por lo que no se incluye en el estudio y el segundo fallece por neumonía a los 30 días de iniciado el estudio.

8.2. ANEXO 2: DENSIDADES ÓPTICAS D.O. INDIVIDUALES DE CARNERILLOS DURANTE EL PERÍODO DE ESTUDIO (ANTÍGENO RB51)

Carnerillos	Días de muestreo															
	0	3	7	15	30	45	60	75	93	97	105	120	135	150	165	180
11	0,281	0,237	0,229	0,238	0,222	0,264	0,489	0,570	0,447	0,487	0,500	0,249	0,275	0,314	0,340	0,391
12	0,179	0,192	0,169	0,144	0,193	0,219	0,253	0,280	0,273	0,255	0,260	0,250	0,311	0,324	0,313	0,293
13	0,229	0,196	0,188	0,217	0,208	0,208	0,370	0,341	0,299	0,288	0,272	0,362	0,273	0,330	0,284	0,255
14	0,586	0,501	0,363	0,395	0,444	0,432	0,458	0,441	0,428	0,414	0,394	0,328	0,365	0,350	0,377	0,320
15	0,203	0,187	0,184	0,199	0,198	0,178	0,172	0,206	0,411	0,418	0,377	0,269	0,246	0,247	0,203	0,291
17	0,238	0,225	0,200	0,244	0,196	0,226	0,187	0,263	0,359	0,401	0,342	0,489	0,382	0,445	0,389	0,296
21	0,202	0,229	0,298	0,382	0,349	0,336	0,345	0,336	0,443	0,697	0,631	0,575	0,533	0,540	0,428	0,407
23	0,221	0,214	0,300	0,392	0,305	0,299	0,264	0,269	0,230	0,591	0,532	0,492	0,522	0,525	0,381	0,343
24	0,297	0,180	0,232	0,287	0,272	0,258	0,325	0,376	0,288	0,550	0,708	0,719	0,625	0,671	0,532	0,459
25	0,336	0,303	0,327	0,477	0,399	0,375	0,446	0,519	0,451	0,952	0,953	0,901	0,874	0,916	0,818	0,643
26	0,343	0,225	0,232	0,297	0,330	0,340	0,300	0,300	0,311	0,636	0,762	0,700	0,611	0,461	0,431	0,437
27	0,190	0,186	0,211	0,221	0,189	0,257	0,212	0,234	0,231	0,242	0,248	0,270	0,272	0,266	0,237	0,268
31	0,291	0,341	0,354	0,356	0,316	0,370	0,400	0,535	0,366	0,873	1,024	0,933	0,775	0,678	0,737	0,757
32	0,234	0,260	0,305	0,301	0,332	0,337	0,385	0,424	0,440	0,789	0,839	0,900	0,716	0,729	0,676	0,584
33	0,260	0,227	0,307	0,297	0,326	0,441	0,411	0,402	0,412	0,773	0,853	0,713	0,627	0,579	0,516	0,523
34	0,185	0,191	0,205	0,197	0,207	0,216	0,281	0,258	0,249	0,826	0,982	0,794	0,724	0,560	0,535	0,401
35	0,246	0,201	0,260	0,287	0,358	0,365	0,508	0,491	0,442	0,746	0,777	0,689	0,649	0,557	0,478	0,426
36	0,581	0,452	0,439	0,479	0,532	0,532	0,508	0,532	0,668	1,072	0,817	0,998	0,861	0,807	0,703	0,659
37	0,336	0,286	0,311	0,327	0,379	0,499	0,527	0,485	0,418	1,023	0,815	0,969	0,835	0,672	0,602	0,632

8.3. ANEXO 3: DENSIDADES ÓPTICAS D.O. INDIVIDUALES DE CARNERILLOS DURANTE EL PERÍODO DE ESTDIO (ANTÍGENO *B. ovis*)

Carnerillos	Días de muestreo															
	0	3	7	15	30	45	60	75	93	97	105	120	135	150	165	180
11	0,627	0,421	0,435	0,196	0,315	0,488	0,580	0,721	0,534	0,590	0,446	0,476	0,383	0,361	0,410	0,448
12	0,289	0,306	0,327	0,261	0,352	0,331	0,384	0,568	0,519	0,491	0,399	0,468	0,442	0,443	0,443	0,519
13	0,329	0,266	0,276	0,240	0,207	0,257	0,376	0,447	0,294	0,279	0,313	0,279	0,226	0,269	0,251	0,212
14	0,598	0,455	0,382	0,264	0,425	0,390	0,559	0,582	0,420	0,426	0,365	0,304	0,293	0,324	0,295	0,312
15	0,336	0,360	0,335	0,362	0,280	0,233	0,258	0,217	0,419	0,431	0,322	0,233	0,234	0,192	0,195	0,218
17	0,353	0,371	0,299	0,271	0,365	0,337	0,444	0,400	0,593	0,550	0,472	0,680	0,409	0,525	0,428	0,409
21	0,294	0,359	0,341	0,316	0,570	0,477	0,552	0,449	0,566	0,879	0,852	0,753	0,641	0,484	0,468	0,374
23	0,399	0,391	0,465	0,422	0,651	0,503	0,574	0,450	0,319	0,755	0,748	0,746	0,706	0,609	0,459	0,448
24	0,473	0,292	0,287	0,256	0,468	0,439	0,531	0,472	0,370	0,718	0,658	0,552	0,554	0,519	0,487	0,472
25	0,461	0,419	0,489	0,478	0,579	0,533	0,700	0,713	0,556	1,177	1,196	1,043	1,105	0,978	0,828	0,810
26	0,398	0,290	0,281	0,351	0,401	0,458	0,563	0,457	0,433	0,645	0,757	0,629	0,594	0,614	0,513	0,575
27	0,236	0,241	0,238	0,306	0,309	0,307	0,477	0,387	0,354	0,370	0,452	0,532	0,572	0,385	0,396	0,539
31	0,239	0,237	0,263	0,318	0,368	0,394	0,567	0,563	0,509	0,915	0,973	0,896	0,855	0,673	0,768	0,766
32	0,267	0,352	0,279	0,328	0,489	0,425	0,482	0,496	0,572	0,698	0,733	0,720	0,765	0,630	0,546	0,795
33	0,338	0,355	0,387	0,345	0,561	0,474	0,701	0,688	0,698	1,064	1,086	1,123	0,802	0,765	0,762	0,873
34	0,194	0,234	0,238	0,274	0,337	0,420	0,483	0,445	0,447	0,840	0,861	0,817	0,631	0,590	0,513	0,487
35	0,325	0,313	0,376	0,501	0,774	0,702	0,642	0,612	0,671	0,753	0,746	0,685	0,625	0,579	0,579	0,529
36	0,500	0,461	0,536	0,504	0,812	0,698	0,628	0,644	0,787	0,982	1,095	0,937	0,802	0,718	0,766	0,962
37	0,290	0,336	0,230	0,312	0,437	0,346	0,564	0,611	0,512	0,948	0,993	0,865	0,822	0,589	0,626	0,902

8.4. ANEXO 4: DENSIDADES ÓPTICAS D.O PROMEDIO DE CARNERILLOS EN EL PERÍODO DE ESTUDIO (ANTÍGENO RB51)

Días de muestreo	Grupos de Carnerillos		
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
0	0,286	0,265	0,305
3	0,257	0,223	0,280
7	0,222	0,267	0,312
15	0,240	0,343	0,321
30	0,243	0,307	0,350
45	0,254	0,311	0,394
60	0,321	0,315	0,431
75	0,350	0,339	0,446
93	0,370	0,326	0,428
97	0,377	0,611	0,872
105	0,358	0,639	0,873
120	0,325	0,610	0,857
135	0,309	0,573	0,741
150	0,335	0,563	0,655
165	0,318	0,471	0,607
180	0,308	0,426	0,569

8.5. ANEXO 5: DENSIDADES ÓPTICAS D.O PROMEDIO DE CARNERILLOS EN EL PERÍODO DE ESTUDIO (ANTÍGENO *B. ovis*)

Días de muestreo	Grupos de Carnerillos		
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
0	0,422	0,377	0,307
3	0,363	0,332	0,327
7	0,342	0,350	0,330
15	0,266	0,355	0,369
30	0,324	0,496	0,540
45	0,339	0,453	0,494
60	0,433	0,566	0,581
75	0,489	0,488	0,580
93	0,463	0,433	0,600
97	0,461	0,757	0,886
105	0,386	0,777	0,927
120	0,407	0,709	0,863
135	0,331	0,696	0,757
150	0,352	0,598	0,649
165	0,337	0,525	0,652
180	0,353	0,536	0,759

AGRADECIMIENTOS

Dedico esta Memoria de Título a mi familia, quienes apoyaron mi sueño de ser Médico Veterinario desde que tuve uso de razón; a mi madre, padre y hermanos, quienes siempre estuvieron a mi lado apoyándome, guiándome en momentos complejos y aconsejándome cuando más lo necesité en este viaje. A mi abuela y abuelo, los que me entregaron valores irremplazables y un cariño excepcional.

A mis amigos y amigas, con los que aprendí a romper lo estructurado y monótono de mis rutinas para poder disfrutar más mis últimos años de la Universidad, además de su apoyo incondicional, risas y buenos momentos. A Verónica, por haberme recibido prácticamente durante toda mi carrera en su hogar y por todas las buenas energías entregadas en esos años.

A Renato, uno de mis grandes pilares en Valdivia, quien me apoyó, contuvo y entregó más de lo que podría haber imaginado, siempre con una sonrisa dispuesto a ayudarme.

A mi pequeño amigo felino Inti, quien me enseñó a tener paciencia y tener más cariño aún por mi profesión y a querer aprender más allá de lo enseñado en la Universidad para mejorar su calidad de vida.

Agradezco las oportunidades que me entregaron diversos Institutos y docentes de la Universidad, permitiéndome ser ayudante de múltiples asignaturas; por la confianza y entregándome la oportunidad de enseñar a muchos estudiantes y aprender enseñando, haciendo especial mención a la Unidad de Anatomía.

A la doctora Bárbara Otto, mi profesora patrocinante, por su comprensión y disposición para guiarme en la realización de esta Memoria, así como a mis profesores evaluadores doctor Moroni y doctor Folch por su tiempo y ayuda para completar este trabajo.