



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Estudio comparado del valor diagnóstico en ovino de 3 antígenos obtenidos de distintas cepas de *Brucella ovis* mediante las pruebas serológicas de ELISA indirecto e inmunodifusión en gel.

Comparative study of the diagnostic value in sheep of 3 antigens obtained from different *Brucella ovis* strains by means of indirect ELISA and gel immunodiffusion serological tests.

Autor

Sabina Andreu Satué

Director/es

Pilar María Muñoz Álvaro
María Jesús de Miguel López

Facultad de Ciencias. Grado en Biotecnología
2019

VISTO DE LOS DIRECTORES DEL TFG

Pilar María Muñoz Álvaro y **María Jesús de Miguel López**, investigadoras de la Unidad de Sanidad Animal del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA) del Gobierno de Aragón, hacen constar que el Trabajo Fin de Grado aquí presentado por **Sabina Andreu Satué** ha sido desarrollado y redactado bajo nuestra dirección y supervisión, por lo que damos el visto bueno a este documento.

Lo que hacemos constar ante quien corresponda, como directoras del trabajo, en Zaragoza a 27 de junio de 2019.



Fdo. María Jesús de Miguel López



Fdo. Pilar María Muñoz Álvaro

ÍNDICE

Resumen	1
Introducción.....	3
Objetivos.....	6
Material y métodos	7
1 Sueros utilizados	7
2 Antígenos comparados	7
3 Inmunodifusión en gel con distintos extractos antigénicos de <i>B. ovis</i>	8
3.1 Titulación de los extractos HS de <i>B. ovis</i> (BoREO, BoCITA y Bo::CAI::CAII) para determinar su concentración óptima de uso.....	8
3.2 Comparación de la sensibilidad y especificidad diagnóstica de la IDG con los distintos extractos HS de <i>B. ovis</i>	9
4 Puesta a punto y validación de un enzimoimmunoensayo indirecto (ELISA-i) para el diagnóstico de la infección por <i>B. ovis</i>	9
4.1 Selección de las condiciones óptimas del ELISA-i y del extracto antigénico más adecuado.....	9
4.2 Determinación del punto de corte y de la sensibilidad y especificidad diagnósticas del ELISA-i.....	10
5 Seguimiento inmunológico mediante IDG y ELISA-i de animales vacunados e infectados experimentalmente con <i>B. ovis</i>	11
Resultados.....	12
1 Inmunodifusión en gel con distintos extractos antigénicos de <i>B. ovis</i>	12
1.1 Titulación de los extractos hs de <i>B. ovis</i>	12
1.2 Sensibilidad y especificidad diagnósticas de la IDG con los distintos extractos hs de <i>B. ovis</i>	12
2 Puesta a punto y validación del ELISA-i con HS de <i>B. ovis</i>	13
3 Estudio serológico de animales vacunados e infectados experimentalmente con <i>B. ovis</i> : un hallazgo inesperado.....	15
Discusión	18
Conclusiones.....	20
Bibliografía.....	22

RESUMEN

La brucelosis o epididimitis ovina causada por *Brucella ovis* ocasiona problemas reproductivos e importantes pérdidas económicas en las ganaderías. A diferencia de *Brucella melitensis* (especie zoonótica objeto de campañas de erradicación), *B. ovis* no es patógena para el hombre y su control no es obligatorio. La erradicación de *B. melitensis* en la Unión Europea conlleva la prohibición de la vacunación con Rev1 (vacuna que también protege frente a *B. ovis*), lo que está favoreciendo una reaparición de la epididimitis ovina en muchas regiones. Para el diagnóstico serológico de la infección por *B. ovis*, se recomiendan las pruebas de Fijación de Complemento, Inmunodifusión en Gel de Agarosa (IDG) y/o Enzimoimmunoensayo indirecto (ELISA-i). En estas pruebas se utiliza un extracto antigénico rico en R-LPS que se obtiene de una cepa de *B. ovis* llamada REO198. Recientes estudios evidencian defectos en el core del R-LPS de REO198 que podrían disminuir su eficacia antigénica. Con el fin de mejorar las herramientas de detección de anticuerpos frente a *B. ovis*, evaluamos la eficiencia diagnóstica de 3 antígenos extraídos de distintas cepas o mutantes de *B. ovis*, incluida REO198. Para ello pusimos a punto y validamos una IDG y un ELISA-i enfrentando estos antígenos a un panel de sueros *Gold Standard* (de animales con cultivo positivo de *B. ovis* y animales libres de brucelosis). En la IDG, el antígeno extraído de un mutante natural de *B. ovis* PA (BoCITA) mejoró la sensibilidad diagnóstica respecto a REO198 en un 12%. Un ELISA-i con este mismo antígeno ofreció una elevada sensibilidad (98%) con total especificidad. Finalmente, utilizamos estas pruebas para realizar el estudio serológico de animales vacunados con el mutante de *B. ovis* BoPA:CAI:CAII Δ wadB e infectados experimentalmente con *B. ovis* PA y descubrimos que la IDG podría ser útil para diferenciar entre animales infectados y vacunados (DIVA).

ABSTRACT

Ovine brucellosis or epididymitis caused by *Brucella ovis* causes reproductive symptoms and important economic losses in livestock. Unlike *Brucella melitensis* (zoonotic species subject of official eradication campaigns), *B. ovis* is not pathogenic for humans and its control is not mandatory. After the eradication of *B. melitensis*, Rev1 vaccine (which protects also against *B. ovis*) is banned in many regions of the European Union and this is favouring a re-emergence of the ovine epididymitis. The tests recommended for *B. ovis* serological diagnosis are the complement fixation test, agarose gel immunodiffusion (AGID) and indirect enzyme-linked immunosorbent assay (i-ELISA). The antigen used for these tests is an R-LPS rich extract obtained from the *B. ovis* strain REO198. Recent studies showed defects in the R-LPS core of REO198 that could compromise its antigenic efficacy. In order to improve the tools for detecting antibodies against *B. ovis*, we evaluated the diagnostic performance of 3 antigens extracted from different *B. ovis* strains or mutants. For this, we set up and validated both AGID and i-ELISA tests with these antigens using a panel of *Gold Standard* sera (from *B. ovis* culture positive and brucellosis-free animals). In the AGID test, an antigen extracted from a natural mutant of the reference strain *B. ovis* PA (BoCITA) showed an improved diagnostic sensitivity (12 points higher) with respect to REO198. The i-ELISA with the same antigen yielded a high sensitivity (98%) value and total specificity. These tests were used to conduct a serological study in animals vaccinated with the *B. ovis* mutant BoPA:CAI:CAII Δ wadB and challenged with *B. ovis* PA and this study showed that AGID would allow to differentiate between infected and vaccinated animals (DIVA).

INTRODUCCIÓN

Brucella ovis es una especie bacteriana gram negativa perteneciente al género *Brucella* que causa una enfermedad de distribución mundial comúnmente conocida como epididimitis contagiosa del carnero o epididimitis ovina. Este nombre se debe a que produce lesiones genitales (orquitis y epididimitis) en los carneros, aunque también afecta a las hembras con cuadros de aborto y placentitis (1). Los machos pueden transmitirse la infección entre ellos por contacto directo de la mucosa oral con excreciones seminales o a través de las hembras, que se contagian por vía venérea durante la monta por un macho infectado y, a su vez, contagian a otros machos, diseminando la infección. Además, las hembras pueden transmitir la infección a la descendencia (*in utero*, perinatalmente o durante la lactancia), favoreciendo la permanencia de *B. ovis* en el rebaño. Este proceso conlleva una gran reducción de la de fertilidad (tanto en machos como en hembras) y un aumento en la mortalidad perinatal de los corderos, ocasionando importantes pérdidas económicas en las ganaderías afectadas (1,2).

A diferencia de otras especies de *Brucella*, como *B. melitensis* (agente causal de la brucelosis en pequeños rumiantes, que también afecta al bovino) o *B. abortus* (propia del ganado bovino), que son zoonóticas, *B. ovis* no es patógena para el hombre y en la mayoría de las regiones no se toman medidas específicas para su control y erradicación, por lo que no existen datos precisos sobre su incidencia y prevalencia. Por el contrario, *B. melitensis* es la principal causa de brucelosis en humanos y lleva décadas siendo objeto de campañas oficiales de erradicación en toda la Unión Europea. La combinación de la vacunación con Rev 1 y el diagnóstico y sacrificio de animales infectados ha permitido erradicar esta infección en gran parte de la UE y en muchas regiones de nuestro país (incluyendo Aragón) (3). La vacuna Rev 1 es una cepa viva atenuada de *B. melitensis* que, además de proteger contra este patógeno, resulta efectiva frente a *B. ovis* (2). Como consecuencia de la erradicación de *B. melitensis*, se han ido retirando los programas de vacunación con Rev 1. Ante la ausencia de vacunación y de controles sanitarios específicos frente a *B. ovis*, esta infección está reemergiendo en Europa y particularmente, en España. Algunas regiones como Aragón, País Vasco o Navarra, han venido incluyendo en sus programas sanitarios el diagnóstico de *B. ovis* en machos, pero las políticas de control basadas exclusivamente en el sacrificio de los machos positivos son insuficientes, como han demostrado varias experiencias en el País Vasco (4) .

En cuanto al diagnóstico de la infección por *B. ovis*, la presencia de orquitis o epididimitis en los machos resulta orientativa, pero hay que tener en cuenta que existen otras bacterias que también generan estas lesiones genitales, como *A. actinomycetemcomitans*, *Histophilus ovis*, *Haemophilus spp.*, *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis*, *B. melitensis* o *Chlamydophila abortus* entre otras (1). La única prueba incontestable de la presencia de *B. ovis* en un rebaño es el aislamiento de la bacteria, que puede realizarse a partir de semen, leche, escobillón vaginal o muestras de necropsia. Sin embargo, el diagnóstico bacteriológico tiene una sensibilidad limitada a nivel individual (pues depende del nivel de excreción del animal en el momento de tomar las muestras y de la experiencia técnica del laboratorio en el que se realiza el diagnóstico), es costoso y lento. Por tanto, para llevar a cabo la vigilancia epidemiológica de los rebaños o el diagnóstico individual en programas de erradicación es necesario disponer de pruebas serológicas que sean suficientemente sensibles y específicas. La Oficina Internacional de Epizootias (OIE) recomienda varias pruebas para el diagnóstico serológico de *B. ovis*: i) la fijación de complemento (FC), ii) la inmunodifusión en gel de agarosa (IDG o AGID) o iii) el ensayo de inmunoenlaces indirecto (ELISA-i). Trabajos anteriores (5,6) han demostrado que se

puede obtener una sensibilidad óptima con la combinación de un ELISA-i y la IDG. La IDG presenta la ventaja de ser una prueba técnicamente sencilla y de bajo coste. No obstante, al no existir métodos estandarizados reconocidos internacionalmente para el ELISA-i y la IDG, la prueba utilizada para certificar animales para su traslado o el comercio internacional es la FC (1). Sin embargo, este test presenta varios inconvenientes, ya que es técnicamente complejo (lo que dificulta su estandarización e interpretación) y mediocre en cuanto a sensibilidad diagnóstica (capacidad para detectar los individuos infectados) (5). El diagnóstico serológico de *B. ovis* presenta problemas no solo de sensibilidad sino también de especificidad (falsas reacciones positivas), que han sido poco estudiados hasta el momento (5,6). Algunas pruebas inmunológicas han evidenciado reacciones cruzadas entre *B. ovis* y otras bacterias que afectan al ganado ovino, como *Dichelobacter nodosus* o *Corynebacterium pseudotuberculosis* (1).

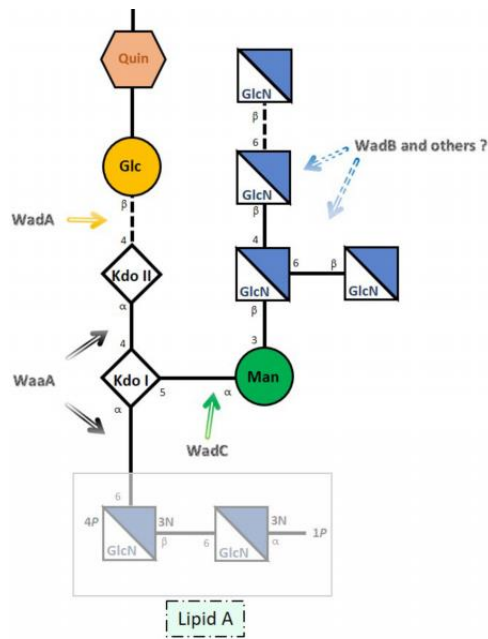
B. ovis es una bacteria naturalmente rugosa (a diferencia de la mayoría de especies de *Brucella*, que son lisas) cuyo lipopolisacárido (LPS) de membrana (R-LPS, del inglés “rough”) juega un papel esencial en su virulencia y antigenicidad (2). El R-LPS es una estructura ramificada que, a diferencia del LPS liso de *B. melitensis*, *B. abortus* o *B. suis*, carece de la cadena de polisacárido O en su región más externa (7). El antígeno utilizado desde hace décadas por consenso en el diagnóstico serológico de *B. ovis* procede de la cepa REO198 (1), la cual, a diferencia de la cepa de referencia (*B. ovis* PA) y de la mayoría de cepas de campo, es CO₂ independiente. Esta característica facilita su crecimiento *in vitro* y la extracción de los complejos solubles de membrana (R-LPS y proteínas de membrana externa –Omp-) utilizados en las pruebas diagnósticas (8). Sin embargo, recientes estudios han puesto en evidencia defectos en el core del R-LPS de REO198 (9) que podrían suponer una merma en la eficacia antigénica de esta cepa en las pruebas serológicas.

Es por ello que los investigadores en brucelosis del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA) y de la Universidad de Navarra (UNAV) se plantearon el estudio de nuevos extractos antigénicos de *B. ovis*, los cuales debían obtenerse en cepas carentes de estos defectos en el R-LPS y, además, estas cepas debían ser capaces de crecer en ausencia de CO₂ (para favorecer los procesos de extracción antigénica, que requieren del crecimiento *in vitro* de la bacteria en grandes cantidades). Estudios recientes han demostrado que la dependencia de CO₂ de *B. ovis* para su crecimiento (requiere atmósferas con 5-10% CO₂) está relacionada con la presencia de dos anhidrasas carbónicas (enzimas capaces de transformar el CO₂ en bicarbonato) en *Brucella*, llamadas CAI y CAII. Según estos estudios, dichas enzimas estarían inactivas en *B. ovis* y en algunas cepas de *B. abortus* CO₂ dependientes, y esta CO₂ dependencia desaparece en mutantes en los que CAII ha recuperado su actividad, lo que explicaría la aparición de cepas CO₂ independientes de forma natural (10). Estos estudios permitieron la construcción de un mutante CO₂ independiente derivado de la cepa de referencia *B. ovis* PA (que no posee el defecto del R-LPS presente en REO198), mediante la inserción de genes que permiten recuperar la actividad de CAI y CAII. Este mutante CO₂ independiente resultaría útil no solo para la producción de extractos antigénicos sino también como cepa parental en la construcción de cepas vacunales.

El objetivo general del presente trabajo era el de mejorar la eficacia diagnóstica de las pruebas serológicas utilizadas hasta el momento (ELISA-i y DG) para detectar la infección por *B. ovis*. Para ello, sustituimos el extracto antigénico de la cepa REO198, utilizado hasta el momento, por nuevos extractos obtenidos de cepas *B. ovis* PA CO₂ independientes (a partir de un mutante natural y de una cepa modificada genéticamente). Además, aunque el desarrollo de vacunas no era un objetivo específico de este trabajo, aplicamos las pruebas puestas a punto con los nuevos

antígenos para realizar el seguimiento inmunológico de los animales de un experimento, realizado en paralelo, para evaluar la protección de una vacuna viva experimental (BoPA:CAI:CAII Δ wadB) frente a la infección por *B. ovis*.

Figura 1. Representación del lipopolisacárido rugoso de membrana (R-LPS) propio de *Brucella ovis*. Las flechas indican las glicosiltransferasas delecionadas en la cepa vacunal BoPA:CAI:CAII Δ wadB. Kdo (ácido 3-deoxi-D-mano-octulosónico), Glc (glucosa), Man (manosa), GlcN (glucosamina) y Quin (quinovosamina). (7)



OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo era lograr una mejora en la eficiencia diagnóstica de las pruebas serológicas que se utilizan para la detección de anticuerpos frente a la infección por *B. ovis*.

Para ello, los objetivos concretos abordados fueron:

1. Valorar la eficiencia diagnóstica en la técnica de inmunodifusión en gel (IDG) de dos nuevos extractos antigénicos, obtenidos de cepas *B. ovis* PA CO₂-independientes, respecto al de la cepa REO198 comúnmente utilizado.
2. Poner a punto y validar un enzimoimmunoensayo indirecto (ELISA-i) para el diagnóstico serológico de la infección por *B. ovis*, utilizando nuevos extractos antigénicos obtenidos de cepas *B. ovis* PA CO₂-independientes.
3. Aplicar las técnicas validadas con los nuevos antígenos al estudio de la respuesta serológica de animales vacunados con el mutante *B. ovis* PA:CAI:CAII Δ wadB y/o infectados experimentalmente con la cepa de referencia *B. ovis* PA.

MATERIAL Y MÉTODOS

1 SUEROS UTILIZADOS

Para la puesta a punto y validación de las pruebas de diagnóstico serológico con los distintos extractos antigénicos de *B. ovis* utilizamos los siguientes sueros de ovino:

- 60 sueros de rebaños libres de brucelosis (población *Gold Standard* negativa).
- 96 sueros de animales con infección de *B. ovis* confirmada mediante cultivo bacteriano (población *Gold Standard* positiva).

Para realizar el seguimiento inmunológico de los corderos de un ensayo de protección vacunal analizamos los siguientes sueros:

- Sueros de 14 corderos libres de brucelosis vacunados (con 10^{10} UFC por vía subcutánea) con la cepa experimental *B. ovis* PA:CAI:CAII Δ wadB (Bo:CAI:CAII Δ wadB) y sueros de 13 corderos libres de brucelosis utilizados como control sin vacunar. Los sueros fueron extraídos el día 0 (antes de la vacunación) y 1, 2, 4, 8, 21, 33, 35 y 41 semanas después de la vacunación. En la semana 33, todos los corderos fueron infectados experimentalmente con la cepa de referencia *B. ovis* PA (cada cordero recibió 10^9 UFC por vía conjuntival y prepucial).

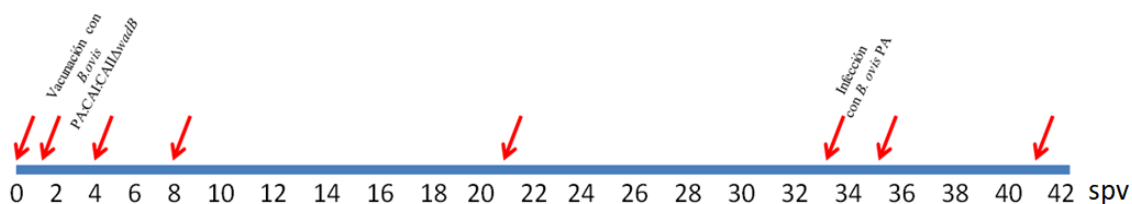


Figura 2. Extracción de sueros de los 14 corderos libres de brucelosis vacunados con Bo:CAI:CAII Δ wadB y los 13 corderos control sin vacunar. Las flechas rojas indican el número de semana post vacunación (spv) en la que se realizó cada extracción. En la semana 1 se realizó la vacunación experimental con *B. ovis* PA:CAI:CAII Δ wadB. En la semana 33 los corderos fueron infectados experimentalmente con la cepa *B. ovis* PA.

2 ANTÍGENOS COMPARADOS

Para seleccionar el extracto antigénico más adecuado, utilizamos los extractos salinos calientes (HS, del inglés *Hot Saline*) de las siguientes cepas de *B. ovis*:

- *B. ovis* REO198 (**BoREO**):

Cepa CO₂ independiente utilizada desde hace décadas para obtener el HS para diagnóstico de *B. ovis* (1,6). El HS de esta cepa fue obtenido en el laboratorio de brucelosis del CITA según la metodología descrita por Marín *et al.*, 1989 (5). Brevemente, las bacterias cultivadas en matraces fueron recogidas mediante filtración tangencial (Pellicón; cassette de 0.16 micras o 100 K de exclusión) en el mínimo volumen posible de PBS y autoclavadas (121°C, 1 atm, 20 min) para obtener la fracción soluble. Tras retirar los restos celulares mediante centrifugación (10.000 rpm, 20 min) y filtrar en papel el sobrenadante, éste fue dializado en agua destilada y posteriormente sometido a ultracentrifugación (100.000 - 130.000 g; 6 horas) para eliminar la mayor cantidad posible de proteínas solubles. El precipitado obtenido (extracto antigénico HS

rico en R-LPS) se disolvió en la mínima cantidad de agua destilada y fue liofilizado y conservado en ambiente seco hasta su utilización. Este extracto antigénico HS se caracteriza por ser rico en lipopolisacárido rugoso (R-LPS) y proteínas de membrana externa (11).

- *B. ovis* PA CO₂ / suero independiente (**BoCITA**):

Mutante natural de *B. ovis* PA obtenido mediante cultivos sucesivos de la cepa de referencia *B. ovis* PA en atmósfera libre de CO₂ y usando como medio de cultivo Blood Agar Base (BAB) libre de suero. El antígeno HS de BoCITA fue obtenido por el mismo método que BoREO (ver arriba).

- *B. ovis* PA::CAI::CAII (**Bo::CAI::CAII**):

Mutante de *B. ovis* PA CO₂ independiente, obtenido en del Dpto. de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Navarra (UNAV) mediante inserción de genes de anhidrasas carbónicas (10). El HS de esta cepa había sido extraído en UNAV siguiendo el método descrito en Marín *et al.* 1989 (5), pero con ligeras variaciones. Brevemente, las bacterias cultivadas en matraces fueron recogidas por centrifugación (7000 g, 20min) y resuspensión en volumen mínimo (1g / 10ml) de suero salino y autoclavadas a vapor fluente (100°C, durante 15min). Tras retirar los restos celulares mediante centrifugación (12.000 g, 15 min, 4°C) y ultracentrifugación (100.000 g a 4°C durante 20 h), el sobrenadante fue dializado en agua destilada y posteriormente centrifugado (12.000 g, 15 min) para eliminar impurezas. El sobrenadante obtenido (extracto antigénico HS) fue liofilizado y conservado en ambiente seco hasta su utilización.

- Cepa vacunal *B. ovis* PA:CAI:CAII Δ wadB (**Bo::CAI::CAII Δ wadB**)

Mutante de *B. ovis* PA CO₂ independiente construido en UNAV mediante inserción de genes de anhidrasas carbónicas (10) y delección del gen *wadB* (7) para ser evaluado como vacuna frente a la infección por *B. ovis* en ovino. El HS de esta cepa se obtuvo en UNAV con el mismo método que el antígeno anterior (Bo::CAI::CAII).

3 INMUNODIFUSIÓN EN GEL CON DISTINTOS EXTRACTOS ANTIGÉNICOS DE *B. OVIS*.

3.1 TITULACIÓN DE LOS EXTRACTOS HS DE *B. OVIS* (BoREO, BoCITA Y Bo::CAI::CAII) PARA DETERMINAR SU CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE USO.

En primer lugar, determinamos la concentración óptima de uso de cada antígeno utilizando un panel reducido de sueros control: i) 14 sueros de corderos libres de brucelosis, ii) 6 sueros de corderos naturalmente infectados por *B. ovis* y iii) 13 sueros de corderos extraídos 2 semanas después de la infección experimental con la cepa de referencia *B. ovis* PA.

Para ello, los antígenos que se conservaban liofilizados fueron reconstituidos en agua destilada estéril y preparados a concentraciones de 10 mg/ml, 5 mg/ml, 2,5 mg/ml, 1,25 mg/ml y 0,625 mg/ml. Hubo que sonicar en repetidas ocasiones las soluciones, ya que algunos antígenos no conseguían disolverse adecuadamente. Por último, estos se mantuvieron congelados a -20°C hasta el momento de su utilización.

Para la preparación del gel, se disolvieron 1 g de agar noble y 10 g de NaCl en 100 ml de buffer borato, llevando la mezcla a ebullición hasta lograr una solución uniforme. A continuación, se pipetearon 9 ml de la solución en una placa de vidrio, obteniendo una capa de gel de 2,5 mm de grosor aproximadamente. Se dejó solidificar durante 20 minutos a temperatura ambiente y una

vez frío se perforó el gel para hacer rosetas de 6 pocillos equidistantes entre sí y respecto a un pocillo central, con una separación de 3 mm.

Se pusieron 20 µl de cada suero en los pocillos externos de la roseta y 20 µl de cada antígeno a las concentraciones mencionadas anteriormente en el pocillo central. En cada placa se añadió un suero conocido como control positivo. Se incubaron los geles a 37°C en cámara húmeda. La lectura de las bandas de precipitación se realizó a las 24 y 48 horas.

Consideramos como óptima la concentración mínima de antígeno que resultó en mayor número de reacciones positivas con los sueros “cultivo positivo”, siendo negativos todos los sueros “libres de brucelosis”.

3.2 COMPARACIÓN DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNÓSTICA DE LA IDG CON LOS DISTINTOS EXTRACTOS HS DE *B. OVIS*.

Utilizando la concentración óptima de cada antígeno (determinada según se indica en el apartado anterior), calculamos la sensibilidad [$100 \times (\text{n}^\circ \text{ de sueros positivos} / \text{n}^\circ \text{ de sueros cultivo positivo testados})$] y especificidad [$100 \times (\text{n}^\circ \text{ de sueros negativos} / \text{n}^\circ \text{ de sueros libres de brucelosis})$] diagnósticas de la prueba de IDG para los antígenos HS de BoREO, BoCITA y Bo::CAI::CAII. Para ello utilizamos un total de 109 sueros cultivo positivo (96 sueros de ovejas y carneros naturalmente infectados por *B. ovis* más 13 sueros de animales infectados experimentalmente con *B. ovis* PA) y 73 sueros de ovino libres de brucelosis. Preparamos los geles siguiendo el protocolo arriba indicado, colocamos el antígeno en los pocillos centrales y los sueros en los pocillos exteriores, incubamos y realizamos la lectura de las bandas de precipitación a las 24 y 48h.

4 PUESTA A PUNTO Y VALIDACIÓN DE UN ENZIMOINMUNOENSAYO INDIRECTO (ELISA-I) PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR *B. OVIS*.

Pusimos a punto y validamos un ELISA-i para el diagnóstico de animales infectados por *B. ovis*.

4.1 SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DEL ELISA-I Y DEL EXTRACTO ANTIGÉNICO MÁS ADECUADO.

En una primera fase seleccionamos las condiciones óptimas del ELISA-i (tipo de placa, concentraciones óptimas de antígenos, conjugado y suero) para el diagnóstico de animales infectados por *B. ovis*. Para ello comparamos los resultados obtenidos con los tres extractos antigénicos de *B. ovis* descritos en el Apdo. 2 (HS de BoREO, BoCITA y Bo::CAI::CAII), frente a un panel representativo (n=16) de sueros ovinos *Gold Standard* (GS) procedentes de animales cultivo positivo (n=8) y libres de brucelosis (n=8). Realizamos los ensayos con dos tipos de placas de polietileno (96 pocillos, fondo plano), unas tratadas para favorecer la unión de las proteínas (Nunc Maxisorp® A/S, Dinamarca) y otras, sin tratamiento específico (Costar®, USA). Testamos los sueros a las diluciones 1/100 y 1/200 y comparamos distintas concentraciones de antígeno (10 µg/ml, 5 µg/ml y 2,5 µg/ml), combinadas con diferentes concentraciones (0,2 µg/ml y 0,4 µg/ml) de conjugado anti-IgG policlonal (Proteína G recombinante conjugada con peroxidasa, Thermo Fisher Scientific, USA). Realizamos las lecturas de densidad óptica (D.O) 15 y 25 minutos después de añadir el sustrato.

Para realizar la adsorción del antígeno a las placas, partimos de los antígenos liofilizados y preparamos soluciones antigénicas a razón de 1 mg/ml en H₂O destilada estéril. Diluimos cada antígeno en tampón carbonato (60 mM y pH 9,6) a las concentraciones requeridas (10 µg/ml, 5 µg/ml y 2,5 µg/ml) y lo dispensamos en las placas correspondientes a razón de 100 µl por

pocillo. Cubrimos las placas con film y las incubamos una noche en incubador a 37°C (en presencia de humedad para evitar la desecación). Transcurrido ese tiempo, retiramos la solución antigénica de las placas y las lavamos tres veces con PBS-Tween20 (polioxietilen-sorbitaán monolaurato –Sigma- al 0,05% en PBS).

Los sueros, diluidos en PBS-Tween20 a razón de 1/100 y 1/200, fueron dispensados en las placas (100µl / pocillo) e incubados a 37°C durante 45 minutos (cubriéndolos con una tapa adhesiva para evitar la evaporación de producto). En cada placa incluimos siempre un suero control positivo y otro negativo (de cada dilución y siempre por duplicado). Tras la incubación y tres ciclos de lavado con PBS-Tween20, añadimos el conjugado (100µl / pocillo) previamente diluido (0,2µg/ml o 0,4µg/ml) en PBS-Tween20 e incubamos de nuevo 45 minutos a 37°C. Para el revelado, lavamos las placas con PBS-Tween20 y añadimos (100 µl / pocillo) una solución de 0,11 mg/ml de ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzo-tiazolín-6-sulfónico (ABTS, Sigma) en tampón citrato (0,05 M, pH 4) con 38% de H₂O₂ previamente diluida a 1/25. Incubamos las placas a temperatura ambiente con agitación y pasados 15, 20 y 25 minutos de la adición del sustrato medimos su absorbancia (D.O) a 405nm en un espectrofotómetro de placas (Multiskan RC; Thermo Labsystems, Vantaa, Finlandia).

Para determinar las condiciones óptimas (tipo de placa, concentración de antígeno y conjugado y tiempo de lectura), calculamos el promedio de las D.O de los 8 sueros GS positivos (D.O_{Prom} P) y de los 8 GS negativos (D.O_{Prom} N), para cada una de las combinaciones, y seleccionamos aquellas condiciones que resultaban en una mayor diferencia entre D.O_{Prom} P y D.O_{Prom} N. También se tuvo en cuenta la resolución entre las poblaciones GS positiva y GS negativa, es decir, se procuró que la distancia entre el suero GS positivo con menor D.O y el suero GS negativo con mayor D.O fuera la máxima.

Para seleccionar el extracto antigénico de *B. ovis* más adecuado, realizamos un segundo ensayo en el que testamos los HS de BoCITA y Bo::CAI::CAII frente a un panel más amplio de sueros (24 GS positivos y 24 GS negativos). Para ello seguimos el protocolo descrito arriba, usando las condiciones seleccionadas en cuanto a tipo de placa, concentración de antígeno y conjugado y tiempo de lectura (los sueros se testaron de nuevo a las diluciones 1/100 y 1/200). Se consideró como óptima la combinación de antígeno y dilución de suero que ofreció mayor resolución entre las poblaciones GS positiva y negativa.

4.2 DETERMINACIÓN DEL PUNTO DE CORTE Y DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNÓSTICAS DEL ELISA-I.

Una vez seleccionado el antígeno de *B. ovis* y las condiciones óptimas del ensayo, procedimos a validar el ELISA-i con una muestra mayor de sueros: 80 sueros GS positivos y 119 sueros GS negativos. Este ELISA-i se realizó siguiendo el protocolo descrito (Apdo. 4.1). Los valores de D.O obtenidos fueron transformados en porcentajes de densidad óptica (% D.O) mediante la fórmula: [%D.O = 100 x (D.O muestra / D.O control positivo)], y procesados mediante análisis estadístico ROC utilizando el programa Medcalc 9.2.1.0. De este modo calculamos la sensibilidad y especificidad diagnóstica para todos los posibles puntos de corte y determinamos como óptimo aquel que permitió la máxima sensibilidad diagnóstica para una especificidad del 100%.

5 SEGUIMIENTO INMUNOLÓGICO MEDIANTE IDG Y ELISA-I DE ANIMALES VACUNADOS E INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON *B. OVIS*.

Aplicamos la IDG y el ELISA-i con distintos extractos antigénicos de *B. ovis* para el seguimiento inmunológico de los corderos de un ensayo cuyo objetivo era evaluar la eficacia de una vacuna experimental frente a la infección por *B. ovis*. Para ello utilizamos los sueros de 14 animales vacunados y de 13 controles sin vacunar extraídos a lo largo del ensayo (ver Apdo. 1).

En primer lugar, todos los sueros de la experiencia fueron sometidos a una prueba IDG con BoREO (utilizada de rutina para la detección de anticuerpos frente a *B. ovis*). A continuación, repetimos la prueba con los antígenos obtenidos de Bo::CAI::CAII (cepa parental del mutante evaluado como vacuna) y Bo::CAI::CAII Δ wadB (cepa vacunal), usando diluciones dobles seriadas desde 10 mg/ml hasta 0.6 mg/ml, frente a un panel de sueros obtenidos 1, 2 y 4 semanas tras la vacunación con *B. ovis* PA:CAI:CAII Δ wadB y sueros del grupo control sin vacunar obtenidos 2 semanas después de la infección experimental con *B. ovis*.

Para completar el estudio serológico de esta experiencia, utilizamos el ELISA-i con antígeno BoCITA puesto a punto y validado en el Apdo. 4. Además, analizamos los sueros del ensayo en un ELISA-i con el antígeno homólogo a la vacuna evaluada. Para poner a punto este ELISA-i con antígeno de Bo::CAI::CAII Δ wadB, seguimos el mismo proceso que con los otros extractos de *B. ovis* (Apdo. 4.1).

RESULTADOS

1 INMUNODIFUSIÓN EN GEL CON DISTINTOS EXTRACTOS ANTIGÉNICOS DE *B. OVIS*.

1.1 TITULACIÓN DE LOS EXTRACTOS HS DE *B. OVIS*

En el experimento de titulación realizado para determinar la concentración óptima de uso de cada antígeno (ver Apto. 3.1 de Material y Métodos), la lectura de las bandas de precipitación realizada a las 24 y 48 horas reveló que los tres antígenos (BoREO, BoCITA y Bo::CAI::CAII) ofrecían resultados positivos con los 19 sueros control cultivo positivo hasta la concentración más baja testada (0,6 mg/ml). Sin embargo, elegimos como concentración óptima de uso 1,25 mg/ml, ya que mostraba unas bandas de precipitación mejor definidas en comparación con otras concentraciones de antígeno. Los seis sueros de corderos libres de brucelosis dieron resultado negativo para los tres antígenos.

1.2 SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNÓSTICAS DE LA IDG CON LOS DISTINTOS EXTRACTOS HS DE *B. OVIS*

Una vez fijamos la concentración óptima de antígeno en 1,25 mg/ml, calculamos la sensibilidad (Dse) y especificidad (Dsp) diagnósticas de la IDG con los antígenos BoREO, BoCITA y Bo::CAI::CAII como se muestra en la Tabla 1. Todos los antígenos presentaron 100% de especificidad (no se observó ninguna banda de precipitación en sueros de animales libres de brucelosis). En cuanto a la sensibilidad, el antígeno BoCITA proporcionó valores más altos (ver Tabla 1). De hecho, este antígeno mejoró en un 12% la sensibilidad diagnóstica de la prueba con respecto al de BoREO utilizado hasta el momento, siendo por tanto el antígeno más idóneo para el diagnóstico serológico de *B. ovis* por IDG.

Tabla 1. Número de animales con cultivo positivo de *B. ovis* (n=109) y libres de brucelosis (n=73) que resultaron positivos en difusión en gel con los antígenos BoREO, Bo::CAI::CAII y BoCITA (1,25 mg/ml). Entre paréntesis, la sensibilidad (Dse) y especificidad (Dsp) diagnósticas calculadas con un intervalo de confianza del 95%.

Antígenos	BoREO	Bo::CAI::CAII	BoCITA
<i>B. ovis</i> cultivo positivo (Dse ¹ , 95% CI)	83/109 (76.15, 67-83.8)	92/109 ³ (84.40, 76.2-90.6)	96/109 (88.07, 80.5-93.5)
Libres de brucelosis (Dsp ² , 95% CI)	0/73 (100, 95.1-100)	0/73 (100, 95.1-100)	0/73 (100, 95.1-100)

1. Dse = 100 x (número de sueros positivos / número de sueros cultivo positivo testados).

2. Dsp = 100 x (número de resultados negativos / número de sueros cultivo negativo testados).

3. El 25 % de los sueros *B. ovis* cultivo positivo dieron 2 ó 3 bandas adicionales para el antígeno Bo::CAI::CAII, mientras que en los otros dos antígenos sólo se observaron 3 sueros con dobles o triples bandas.

2 PUESTA A PUNTO Y VALIDACIÓN DEL ELISA-I CON HS DE *B. OVIS*

En el primer ensayo realizado con una muestra de 16 sueros *Gold Standard* ovinos, i.e. procedentes de 8 animales cultivo-positivo (GS-positivo) y 8 libres de brucelosis (GS-negativo), fijamos la concentración óptima de antígeno en 2,5 µg/ml, ya que las concentraciones superiores no mejoraban significativamente el resultado final (las diferencias entre los valores promedio de D.O de los sueros GS positivos y GS negativos fueron similares).

En esta primera fase descartamos el antígeno BoREO porque, en general, producía valores de densidad óptica más altos en los sueros GS-negativos (a este fenómeno le llamamos “ruido de fondo”) que los otros dos antígenos, y algunos de estos sueros GS-negativos ofrecían valores de D.O tan elevados como algunos sueros GS-positivo, comprometiendo la resolución del ELISA.

Este ensayo también nos permitió seleccionar las placas de polietileno Costar® sin tratamiento específico como idóneas, porque ofrecían mayores diferencias y resolución entre GS-positivos y GS-negativos, al mostrar menos “ruido de fondo” que las placas Nunc Maxisorp® (pretratadas para aumentar la adsorción de proteínas).

En un segundo ensayo testamos los antígenos BoCITA y Bo::CAI::CAII frente a una colección de 24 sueros GS positivos y 24 sueros GS negativos para seleccionar cuál tenía mejor rendimiento diagnóstico. Además, determinamos otra serie de parámetros óptimos como la concentración de conjugado, dilución de suero y tiempo de lectura. Como indica la Tabla 2, los antígenos Bo:CAI::CAII y BoCITA mostraron diferencias similares entre GS positivos y GS negativos, este último destacando por unos valores de resolución mejores. Escogimos como dilución óptima de suero 1/100 ya que a 1/200 el valor de diferencia entre sueros GS positivos y GS negativos disminuía. Además, fijamos en 0,2 µg/ml la concentración óptima de Proteína G debido a que con 0,4 µg/ml ni la diferencia ni la resolución mejoraban de forma significativa.

Tabla 2. Valores de diferencia y resolución para los antígenos Bo::CAI::CAII, BoCITA y BoREO en el ELISA-i testado en placas Costar® sin tratamiento. Se muestran los resultados obtenidos con la concentración de antígeno 2,5 µg/ml, las diluciones de sueros 1/100 y 1/200, las concentraciones de conjugado 0,2 µg/ml y 0,4 µg/ml y el tiempo de lectura a 15 minutos.

Proteína G	Bo::CAI::CAII				BoCITA			
	Dif ¹		Res ²		Dif		Res	
	1/100	1/200	1/100	1/200	1/100	1/200	1/100	1/200
0,2 µg/ml	1,0	0,8	-0,3	-0,2	1,1	0,9	0,0	0,0
0,4 µg/ml	1,2	1,0	-0,3	-0,2	1,2	1,0	-0,1	-0,1

1. Dif: diferencia entre el promedio de las D.O de 24 sueros GS positivos ($D.O_{Prom P}$) y de 24 sueros GS negativos ($D.O_{Prom N}$).

2. Res: resolución entre poblaciones GS positiva y GS negativa (distancia entre el suero GS positivo con menor D.O y el suero GS negativo con mayor D.O).

Finalmente seleccionamos el antígeno BoCITA ya que es el que ofreció una mayor resolución entre los sueros GS positivos y negativos. Como se puede ver también en la Figura 3, los dos antígenos ofrecieron resultados muy similares, aunque el antígeno BoCITA permitió obtener valores de D.O más bajos para uno de los sueros GS negativo, que superaba los niveles de D.O deseables en el ELISA con Bo::CAI::CAII.

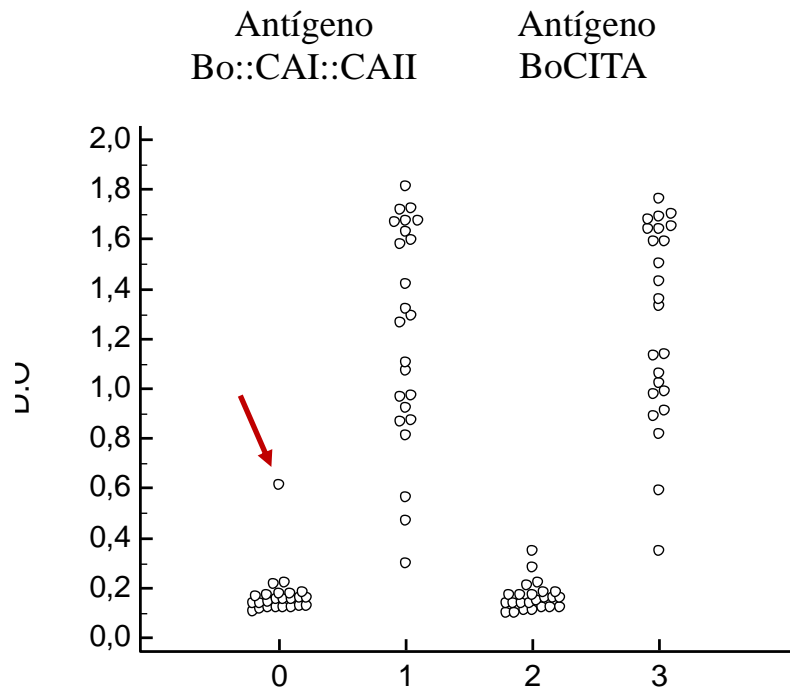


Figura 3. Valores de densidad óptica (D.O) obtenidos para los sueros GS negativos (0 y 2) y GS positivos (1 y 3) frente a los antígenos BoCITA y Bo::CAI::CAII. La flecha roja indica el suero GS negativo cuya D.O resultó mayor al utilizar el antígeno Bo::CAI::CAII, empeorando considerablemente la resolución del test (motivo por el cual se seleccionó el antígeno BoCITA).

En el ensayo de validación utilizamos un panel mucho más amplio de sueros frente al antígeno BoCITA con las condiciones óptimas fijadas en los ensayos anteriores. Determinamos como punto de corte óptimo un porcentaje de densidad óptica del 50% (ver Figura 4). Este valor es el que permite la máxima sensibilidad diagnóstica (97,5%) para una especificidad del 100%, lo cual es un requisito prioritario en brucelosis.

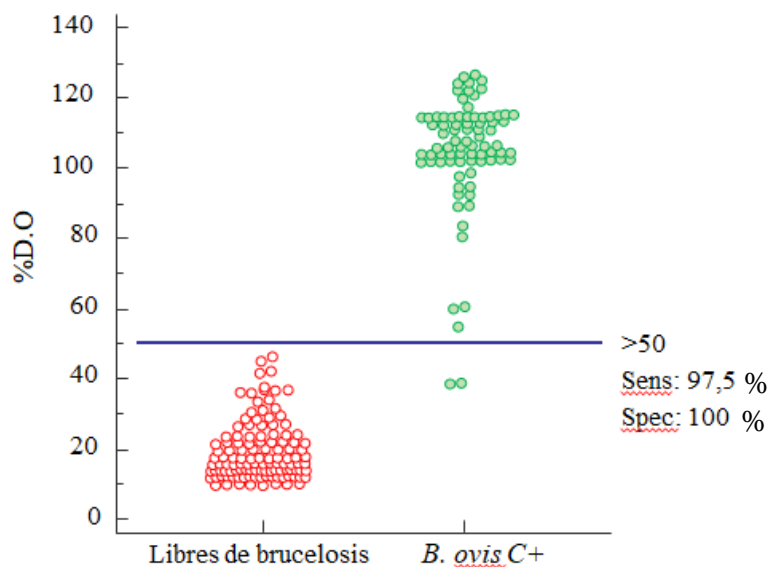


Figura 4. Porcentajes de densidad óptica obtenidos en el ELISA-i al analizar los sueros ovinos de animales con cultivo positivo de *B. ovis* (GS positivo, derecha) y animales de rebaños libres de infección (GS negativo, izquierda). La línea horizontal indica el punto de corte (50% D.O) que permite la máxima sensibilidad diagnóstica (Sens) con una especificidad (Spec) del 100%.

3 ESTUDIO SEROLÓGICO DE ANIMALES VACUNADOS E INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON *B. OVIS*: UN HALLAZGO INESPERADO.

Al utilizar la IDG con el antígeno BoREO para el seguimiento de la respuesta serológica de los corderos en la experiencia de protección vacunal mencionada arriba (Apdo. 5 de Material y Métodos), observamos que los animales vacunados con el mutante Bo::CAI::CAII Δ wadB no reaccionaban en dicha prueba tras la vacunación (ver Figura 5). Para comprobar el motivo de esta falta de reactividad, repetimos la prueba con otros dos antígenos: Bo::CAI::CAII (HS obtenido de la cepa parental del mutante vacunal) y Bo::CAI::CAII Δ wadB (HS obtenido de la cepa vacunal) a diferentes concentraciones.

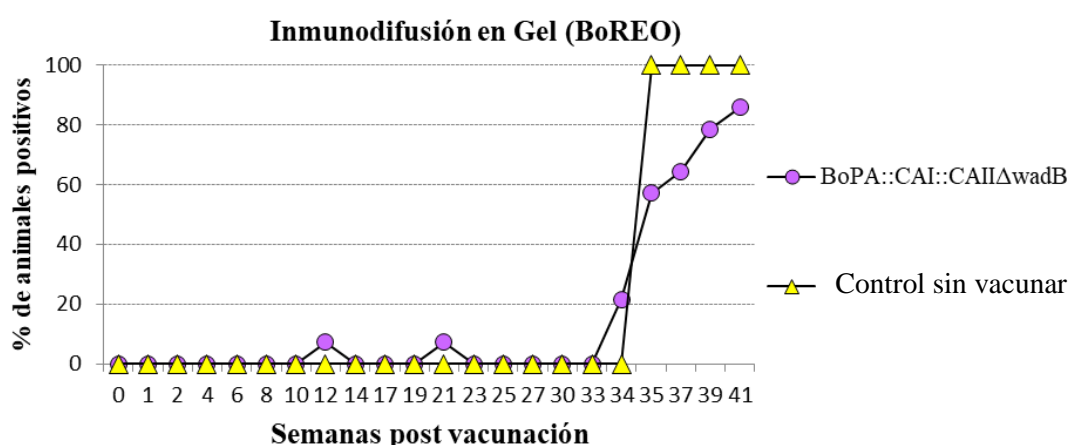


Figura 5. Porcentaje de animales positivos en la IDG con el antígeno BoREO frente a sueros control de animales no vacunados y sueros de animales vacunados con el mutante Bo::CAI::CAII Δ wadB. En la semana 33 todos los animales fueron infectados experimentalmente con la cepa de referencia *B. ovis* PA.

Como muestra la Tabla 3, los dos antígenos utilizados (Bo::CAI::CAII y BoREO) dieron reacción con los 6 sueros control positivo de la colección del CITA (procedentes de ovejas cultivo-positivo naturalmente infectadas). También resultaron positivos los 13 sueros de corderos no vacunados (grupo control) 2 semanas después de ser infectados experimentalmente con *B. ovis* (y que resultaron en su mayoría cultivo positivo al final de la experiencia). Independientemente de la concentración, con los antígenos BoREO y Bo::CAI::CAII detectamos el mismo número de animales infectados, por lo que 1,25 mg/ml sería una concentración óptima de uso (coincidiendo con lo observado en el Apdo. 1.2).

Para detectar los animales vacunados fue necesario subir a 10 mg/ml la concentración de todos los antígenos ya que a concentraciones inferiores se obtenían un número mucho menor de resultados positivos (lo que explica la falta de reactividad en el primer ensayo –Figura 1– con BoREO a 1,25 mg/ml). A esta concentración observamos que tanto con el antígeno de la cepa parental (Bo::CAI::CAII) como con el antígeno homólogo (Bo::CAI::CAII Δ wadB) prácticamente el total de los animales vacunados reaccionaron en la primera semana, mientras que con el antígeno BoREO la mayoría de los animales no reaccionaron hasta la segunda semana post-vacunación.

Cuando utilizamos el antígeno extraído de la cepa vacunal (Bo::CAI::CAII Δ wadB), solo un suero del panel de animales infectados reaccionó, tanto a 1,25 mg/ml como a 10 mg/ml. Sin embargo, este antígeno sí que dio reacción para los sueros de corderos vacunados en las semanas 1, 2 y 4 post vacunación. Por tanto, la IDG podría ser un buen test a la hora de diferenciar animales vacunados de infectados (estrategia DIVA, Differentiating Infected from Vaccinated Animals).

Tabla 3. Número y porcentaje de animales positivos en la prueba de IDG para los antígenos BoREO, Bo::CAI::CAII y Bo::CAI::CAII Δ wadB en las diluciones 1,25 mg/ml (dilución óptima de uso) y 10 mg/ml. Cada antígeno fue testado frente a una colección de 6 sueros cultivo positivo de animales infectados por *B. ovis*, 13 sueros control de corderos sin vacunar, y 14 sueros de corderos libres de brucelosis vacunados con la cepa experimental *B. ovis* PA::CAI::CAII Δ wadB extraídos 1, 2 y 4 semanas después de la vacunación.

		BoREO	Bo::CAI::CAII	Bo::CAI::CAII Δ wadB			
Animales	Semanas post vacunación/infección	Número (%) de animales positivos a 1,25mg/ml y 10mg/ml					
		1,25	10	1,25	10	1,25	10
<i>B. ovis</i> cultivo positivo (n=6)	-	6 (100)	6 (100)	6 (100)	6 (100)	1 (16,7)	1 (16,7)
Control sin vacunar (n=13)	2 SPI¹	11 (84,6)	11 (84,6)	11 (84,6)	11 (84,6)	0	0
Vacunados con Bo::CAI::CAII ΔwadB (n=14)	1SPV²	2 (14,3)	4 (28,6)	1 (7,1)	14 (100)	6 (42,9)	13 (92,9)
	2SPV	7 (50,0)	13 (92,9)	0	4 (28,6)	8 (57,1)	12 (85,7)
	4SPV	8 (57,1)	7 (50,0)	0	1 (7,1)	4 (28,6)	6 (42,9)

1. SPI: semanas post infección 2. SPV: semanas post vacunación

En el ELISA-i que llevamos a cabo con el antígeno BoCITA, observamos un pico de positivos en la segunda semana después de la vacunación para los sueros procedentes de animales vacunados. El porcentaje de animales positivos va decayendo a partir de la segunda semana tras la vacunación. Sin embargo, este porcentaje vuelve a aumentar en la semana 33 como consecuencia de la infección experimental con *B. ovis* PA (ver Figura 6).

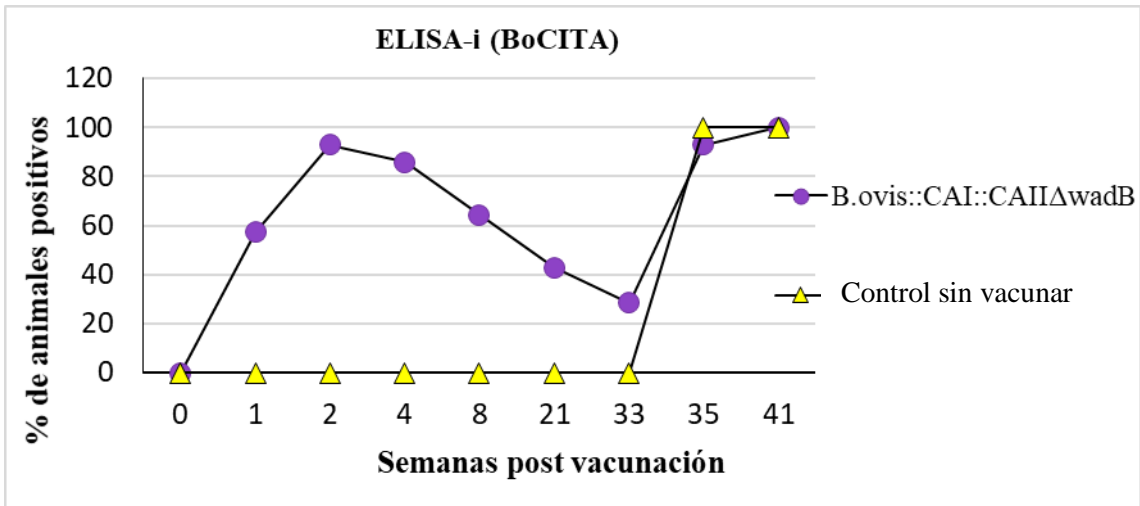


Figura 6. Porcentaje de animales positivos para cada semana post-vacunación en el ELISA-i con el antígeno BoCITA frente a sueros de animales no vacunados utilizados como control y sueros de animales vacunados con el mutante Bo::CAI::CAIIΔwadB. En la semana 33 se procede a la infección experimental de todos los animales con la cepa de referencia *B.ovis* PA.

En cuanto al ELISA-i que realizamos con el antígeno Bo::CAI::CAIIΔwadB, las condiciones óptimas seleccionadas en la fase de puesta a punto fueron las mismas que para el ELISA con BoCITA (placas Costar ® sin tratamiento, 2,5 µg/ml de antígeno, dilución de suero 1/100, 0.2 µg/ml de conjugado y lectura a 15 min). Con el antígeno homólogo a la cepa vacunal observamos que los sueros procedentes de animales vacunados con Bo::CAI::CAIIΔwadB presentaron buena reactividad (más que en IDG) frente a su antígeno homólogo (ver Figura 7), siendo el 100% positivos prácticamente hasta la semana 33 (día de la infección experimental).

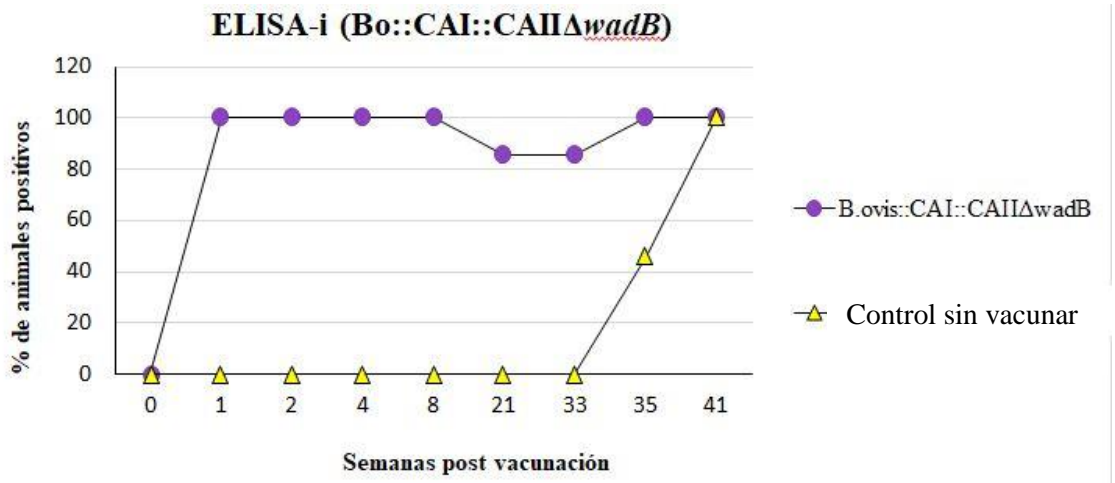


Figura 7. Porcentaje de animales positivos para cada semana post-vacunación en el ELISA-i con el antígeno Bo::CAI::CAIIΔwadB, frente a sueros de animales no vacunados utilizados como control y sueros de animales vacunados con el mutante *B.ovis* PA:CAI:CAIIΔwadB. En la semana 33 se procede a la infección experimental de todos los animales con la cepa de referencia *B.ovis* PA.

DISCUSIÓN

El ELISA-i y, en menor medida, la IDG son pruebas comúnmente utilizadas para el diagnóstico de *B. ovis* (5,6,12) y útiles para caracterizar la producción de anticuerpos tras una vacunación o infección experimental con *B. ovis* (13,14).

Nuestro objetivo era comparar la eficiencia diagnóstica de distintos extractos antigénicos de *B. ovis* para tratar de mejorar las pruebas que usábamos (IDG y ELISA). Estas pruebas mejoradas serían aplicadas para realizar el estudio serológico de parte de los animales en una experiencia de protección en corderos con una cepa candidata a vacuna frente *B. ovis*.

A la hora de poner a punto cualquiera de estas dos técnicas, es imprescindible titular los antígenos. Las extracciones antigénicas son artesanales y además, puede haber diferencias del protocolo de extracción entre laboratorios. Esto puede generar variaciones en los porcentajes de R-LPS y proteínas que se traducen en mayor o menor rendimiento diagnóstico. Además, pueden producirse contaminaciones de los extractos que dan lugar a reacciones inespecíficas, por lo que es esencial comprobar que no hay bandas en los sueros control negativos.

El HS utilizado actualmente en el diagnóstico de *B. ovis* se obtiene a partir de la cepa *B. ovis* REO198 (1,8). Esta cepa fue elegida en su momento por ser capaz de crecer en ausencia de CO₂. Por lo general *B. ovis* requiere 5-10% de CO₂ en atmósfera para su crecimiento y esto limita su cultivo a gran escala para la producción de antígenos o vacunas. Por ello los investigadores del CITA y la UNAV buscaron estrategias para obtener cepas de *B. ovis* CO₂ independientes (10). Sin embargo, los defectos en el core del R-LPS de esta cepa (9) podrían suponer una reducción en la sensibilidad de las pruebas diagnósticas. De hecho, el uso de los antígenos BoCITA y Bo::CAI::CAII, obtenidos a partir de cepas *B. ovis* PA CO₂ independientes que no presentan este defecto en el core, permitió mejorar la sensibilidad diagnóstica frente a BoREO en la prueba de IDG. El mayor porcentaje de bandas múltiples observado al usar el antígeno Bo::CAI::CAII podría ser debido a diferencias en el proceso de extracción (de UNAV respecto a CITA) que han favorecido la presencia de proteínas en mayor porcentaje en este HS. Esto explicaría también las ligeras diferencias encontradas en el ELISA-i y el hecho de que uno de los sueros control negativo muestre “ruido de fondo” con este antígeno. Esto podría confirmarse realizando un Western Blot o un análisis proteómico de los extractos. El antígeno BoCITA sería un buen sustituto de BoREO para el diagnóstico serológico de *B. ovis*, al observarse una mejora de la sensibilidad diagnóstica.

El protocolo de ELISA-i que utilizamos se basa en el descrito por Marín *et. al* (5,6) con ligeras diferencias. La principal variación radica en el tipo de placas: utilizamos placas Costar ® sin pretratamiento en lugar de placas Nunc Maxisorp ® tratadas para aumentar la adsorción de proteínas. Estas últimas dieron un mayor ruido de fondo en los sueros negativos, lo que reducía la resolución entre positivos y negativos, obteniendo mejores resultados con las placas sin tratar. A la hora de utilizar un ELISA para diagnóstico serológico resulta imprescindible que esté adecuadamente validado. El ensayo debe ponerse a punto con poblaciones *Gold Standard* de sueros tanto positivas como negativas y fijando un punto de corte adecuado, teniendo como requisito prioritario la máxima sensibilidad diagnóstica que asegure el 100% de especificidad (15). En el caso de otras enfermedades animales, como algunos virus pandémicos que se propagan de forma epizootica, es un requisito esencial que el test diagnóstico asegure la sensibilidad máxima para permitir intervenciones tempranas. En estos casos podría justificarse

el uso de un punto de corte que maximice la sensibilidad aunque la especificidad no sea del 100%, como recomiendan algunos autores que aplican el Índice de Jouden (la suma de especificidad y sensibilidad debe ser el valor máximo). Por el contrario, en enfermedades enzoóticas de más lenta propagación como la brucelosis, y en procesos de erradicación en los que evitar las reacciones serológicas falsas positivas es importante, el objetivo siempre es proporcionar una especificidad de prueba perfecta, es decir, del 100%.

El interés en el desarrollo de una vacuna específica para *B. ovis* ha aumentado considerablemente tras la prohibición de la vacunación con Rev1 en muchos países. En las últimas décadas se han publicado diversos estudios sobre vacunas específicas frente a *B. ovis*, pero a día de hoy no hay ninguna disponible. La mayoría de las vacunas propuestas exigen protocolos de inmunización repetidos que dificultarían su administración e implementación o resultan muy costosas de producir, por basarse en el uso de subcomponentes bacterianos acompañados de adyuvantes de nueva generación de disponibilidad limitada y elaboración compleja (14,16,17). Una vacuna viva rugosa, que no interfiera en el diagnóstico de las brucelas lisas en las campañas oficiales de saneamiento, sería la solución más satisfactoria, si bien, esta debería complementarse con alguna prueba DIVA, que permita diferenciar los animales realmente infectados por *B. ovis* de los vacunados.

En la prueba de IDG rutinaria con la que realizamos el estudio serológico de los animales vacunados con Bo::CAI::CAII Δ wadB, estos no reaccionaban frente a los antígenos de *B. ovis*. Es posible que la vacuna no indujera la producción de anticuerpos en cantidades mínimamente detectables. Por otra parte, podría ser que la delección del gen *wadB* en *B. ovis* (7) dé lugar a la pérdida de un epítipo importante desde el punto de vista inmunológico. El hecho de que el antígeno homólogo proporcione un alto porcentaje de reaccionantes apoya esta última hipótesis. Obtuvimos un hallazgo inesperado, un test DIVA que permite diferenciar animales vacunados de infectados.

El ELISA-i utilizando BoCITA como antígeno no podría utilizarse como test DIVA, porque en este caso sí que reaccionan los animales vacunados (aunque en menor medida que en el ELISA con antígeno homólogo). Esto se explicaría por la exposición de distintos epítopos en una y otra matriz.

Aunque el antígeno homólogo dio lugar a un alto porcentaje de animales reaccionantes, la vacuna no protegió (resultados no publicados). Esto significa que el estímulo de la infección producida por la cepa vacunal no fue suficiente para generar una respuesta inmune efectiva (que tiene que ser de tipo celular, no solo anticuerpos) frente a *B. ovis* (13,14). Esto podría ser debido a: (i) una atenuación excesiva de la cepa vacunal, (ii) que el epítipo eliminado juega un papel esencial en la respuesta inmune específica frente a *B. ovis*. Nuestros resultados serológicos apoyan la hipótesis (ii) pero no podemos descartar la (i), ya que no hemos hecho ningún experimento para caracterizar la distribución y persistencia de la cepa vacunal en ovino (18). Por tanto, podría ser una combinación de la dos.

CONCLUSIONES

Partiendo de los objetivos fijados al inicio del trabajo y en función de los resultados obtenidos en los experimentos realizados, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1. El antígeno BoCITA mejoró en un 12% la sensibilidad diagnóstica de la IDG con respecto al antígeno BoREO, siendo por tanto el antígeno más idóneo para el diagnóstico serológico de *B. ovis* por esta técnica inmunológica.
2. El antígeno BoCITA mejoró la eficiencia diagnóstica de un ELISA-i, ofreciendo un 98% de sensibilidad diagnóstica y un 100% de especificidad.
3. Tanto la IDG como el ELISA-i con el nuevo antígeno BoCITA resultaron útiles para estudiar la evolución de anticuerpos en un experimento de vacunación y protección frente a *B. ovis* en ovejas.
4. El estudio serológico en animales vacunados con *B. ovis* PA:CAI:CAII Δ wadB mostró que la IDG podría servir como estrategia para diferenciar los animales vacunados de los infectados.

CONCLUSIONS

Based on the objectives set at the beginning of the study and according to the results obtained in the experiments, the following conclusions have been reached:

1. The BoCITA antigen in the AGID test showed an improved diagnostic sensitivity (12 points higher) with respect to the BoREO antigen, being therefore the most suitable antigen for the serological diagnosis of *B. ovis* by this immunological test.
2. The BoCITA antigen improved the diagnostic efficiency of the i-ELISA, offering 98% diagnostic sensitivity and 100% specificity.
3. Both IDG and i-ELISA tests carried out with the new BoCITA antigen were useful for studying the evolution of antibodies in a vaccination and protection experiment against *B. ovis* in sheep.
4. The serological study in animals vaccinated with *B. ovis* PA: CAI: CAII Δ wadB showed that the AGID could serve as a strategy to differentiate the vaccinated animals from the infected ones.

BIBLIOGRAFÍA

1. **OIE.** Ovine epididymitis (*Brucella ovis*). Chapter 2.7.8 in: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2015. Paris, France. Versión adoptada por la Asamblea Mundial de Delegados de la OIE en mayo de 2015.
2. **Corbel MJ.** Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis.* 1997 Apr-Jun;3(2):213-221.
3. **Blasco J, Marin C, Jiménez de Bagués M, Hernández A et al.** Evaluation of Allergic and Serological Tests for Diagnosing *Brucella melitensis* Infection in Sheep. *J Clin Microbiol.* May 1994;32(8):1835-1840.
4. **Marco, J., González, L., Cuervo, L.A., De-Heredia, F.B., Barberán, M., Marín, C., Blasco, J.M.,** 1994. *Brucella ovis* Infection in Two Flocks of Sheep. *Vet Rec* 135, 254-256.
5. **Marin C, Jimenez de Bagues M, Blasco J, Gamazo C, Moriyon I, Diaz R.** Comparison of three serological tests for *Brucella ovis* infection of rams using different antigenic extracts. *Vet Rec.* 1989 Nov 11;125(20):504–508.
6. **Ficapal A, Alonso-Urmeneta B, Velasco J, Moriyon I, Blasco J.** Diagnosis of *Brucella ovis* infection of rams with an ELISA using protein G as conjugate. *Vet Rec.* 1995 Aug 5;137(6):145–147.
7. **Salvador-Bescós M, Gil-Ramírez Y, Zúñiga-Ripa A, Martínez-Gómez E, de Miguel MJ, Muñoz PM, et al.** WadD, a New *Brucella* Lipopolysaccharide Core Glycosyltransferase Identified by Genomic Search and Phenotypic Characterization. *Front Microbiol.* 2018 Sep 27;9.
8. **Riezu-Boj JI, Moriyon I, Blasco JM, Marín C, Díaz R.** Comparison of lipopolysaccharide and outer membrane protein-lipopolysaccharide extracts in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella ovis* infection. *J Clin Microbiol.* 1986;23(5):938–942.
9. **Pedro Soler Lloréns.** Desarrollo de nuevas vacunas frente a *Brucella ovis*: Estudio de genes implicados en la síntesis del núcleo del lipopolisacárido. 4 de julio de 2014. Sobresaliente “cum laude”. Tesis Europea. Directores: I. López Goñi y M.J. Grilló.
10. **Etayo LP, Miguel MJ De, Álvarez RC, Muñoz PM, Khames M, Iriarte M, et al.** The - CO 2 - dependence of *Brucella ovis* and *Brucella abortus* biovars is caused by defective carbonic anhydrases. *Vet Res.* 2018;49(1):1–12..
11. **Riezu-Boj JI, Moriyon I, Blasco JM, Gamazo C DR.** Antibody response to *Brucella ovis* outer membrane proteins in ovine brucellosis. *Infect Immunity.* 1990;58(2):489-494.
12. **Ficapal A, Jordana J, Blasco J., Moriyón I.** Diagnosis and epidemiology of *Brucella ovis* infection in rams. *Small Rumin Res.* 1998 Jun 15;29(1):13–19..
13. **Jiménez de Baugés MP, Marín CM, Blasco JM.** Effect of antibiotic therapy and strain-19 vaccination on the spread of *brucella melitensis* within an infected dairy herd. *Prev Vet Med.* 1991;11(1):17–24.
14. **Da Costa Martins R, Irache JM, Blasco JM, Muñoz MP, Marín CM, Jesús Grilló M, et al.** Evaluation of particulate acellular vaccines against *Brucella ovis* infection in rams. *Vaccine* 2010 Apr 9;28(17):3038–3046.
15. **Ducrottoy MJ, Muñoz PM, Conde-Álvarez R, Blasco JM, Moriyón I.** A systematic review of current immunological tests for the diagnosis of cattle brucellosis. *Prev Vet Med.* 2018;151: 57–72.
16. **Muñoz PM, Estevan M, Marín CM, Jesús De Miguel M, Jesús Grilló M, Barberán**

- M, et al.** Brucella outer membrane complex-loaded microparticles as a vaccine against *Brucella ovis* in rams. *Vaccine*. 2006 Mar;24(11):1897–1905.
17. **Estein SM, Fiorentino MA, Paolicchi FA, Clause M, Manazza J, Cassataro J, et al.** The polymeric antigen BLSOmp31 confers protection against *Brucella ovis* infection in rams. *Vaccine*. 2009 Nov 12;27(48):6704–11.
 18. **Barrio MB, Grilló MJ, Muñoz PM, Jacques I, González D, de Miguel MJ, et al.** Rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export induce antibodies reacting in an indirect ELISA with smooth lipopolysaccharide and are less effective than Rev 1 vaccine against *Brucella melitensis* infection of sheep. *Vaccine*. 2009 Mar 10;27(11):1741–9.