

**Universidad Nacional
Facultad de Ciencias de la Salud
Escuela de Medicina Veterinaria**

***Brucella* spp. en el hato ovino costarricense**

**Tesis para optar por el Grado Académico de Licenciatura en
Medicina Veterinaria**

Oswaldo Barrantes Granados

**Tutor: Dr. Danilo Montero Caballero
Co-tutora: Dra. Gabriela Hernández Mora**

**Lectores:
Dr. Edgardo Moreno Robles
Dr. Juan José Romero Zúñiga
Dra. Rocío González Barrientos**

Campus Presbítero Benjamín Núñez

2015

Tribunal Examinador

M.Sc. M^a Antonieta Corrales Araya
(Decana)

Firma _____

Dra. Laura Bouza Mora
(Subdirectora)

Firma _____

Dr. Danilo Montero Caballero
(Tutor)

Firma _____

Dra. Gabriela Hernández Mora
(Co-tutora)

Firma _____

Dr. Juan José Romero Zúñiga
(Lector)

Firma _____

Dra. Rocío González Barrientos
(Lectora)

Firma _____

Fecha: _____

DEDICATORIA

A Dios Padre por toda la fortaleza, bendición y entendimiento dado durante toda la carrera y en el transcurso de esta investigación.

A mi padre y a mi madre, por estar continuamente a mi lado brindándome su apoyo incondicional y los mejores consejos, por su ejemplo, el arduo esfuerzo y la dedicación tenaz mostrada en sus vidas que me han indicado como siempre se debe seguir adelante.

AGRADECIMIENTO

A la Dra. Gabriela Hernández Mora y al Dr. Danilo Montero Caballero, por todo el apoyo, consejos, asesoría y conocimiento brindados tan amablemente durante la investigación.

A los demás miembros de mi Comité Asesor, Dr. Edgardo Moreno Robles, Dr. Juan José Romero Zúñiga y Dra. Rocío González Barrientos, quienes siempre estuvieron con la mejor disposición de colaborar en todo lo que les solicité a lo largo del estudio.

Al Servicio Nacional de Salud Animal, por darme la oportunidad de desarrollar esta importante investigación para el país.

Al Programa de Investigación en Enfermedades Tropicales de la Universidad Nacional y a su personal, por toda la colaboración brindada para llevar a cabo satisfactoriamente este proyecto, en especial al Dr. Elías Barquero Calvo y a la Dra. Caterina Guzmán Verri.

Al Departamento de Patología de la Escuela de Medicina Veterinaria por el apoyo brindado al estudio.

RESUMEN

La brucelosis en ovinos es causada por *Brucella melitensis*, *B. abortus*, y *B. ovis*, provocando principalmente en el caso de las dos primeras especies, problemas en la reproducción de las hembras y en el caso de *B. ovis*, epididimitis contagiosa del carnero. Ante el auge de la producción ovina en Costa Rica, el presente estudio da a conocer el estado actual de la brucelosis en estos animales en el país. Para este fin, se obtuvieron sueros de 510 animales pertenecientes a diez fincas distribuidas en ocho regiones a nivel nacional. A estas muestras se les realizó la prueba de Rosa de Bengala (RB) por dos métodos, el de rutina utilizado para bovinos y la modificación sugerida por la OIE para ovinos. También, estas muestras fueron analizadas utilizando ELISA indirecto (ELISAi), ELISA competitivo (ELISAc) y la prueba de fluorescencia polarizada (FPA). Para la validación y evaluación del rendimiento de todas las pruebas se utilizó 20 sueros de ovinos con aislamiento de *B. melitensis* y 20 sueros libres de brucelosis. Además, tres de los animales que resultaron positivos en RB y en ambos ELISAs, fueron sacrificados, obteniéndose aislamientos morfológicamente y bioquímicamente compatibles con *Brucella* spp., sin embargo, la caracterización molecular, la inmunohistoquímica y la inmunofluorescencia directa realizada en estos aislamientos revelaron que no pertenecían al género *Brucella*. En términos generales, la seroprevalencia contra antígenos de *Brucella* en ovinos a nivel nacional obtenida es baja, ya que correspondió de 0.2 % al 0.98 % en la población analizada, y por lo tanto, se deben seguir apoyando a los productores nacionales y establecer reglamentaciones para proteger al hato

ovino nacional y limitar el ingreso de animales vivos solamente de países con prevalencias igual o menores a las descritas para Costa Rica.

ABSTRACT

Brucellosis in sheep is caused by *Brucella melitensis*, *B. abortus*, and *B. ovis*, causing mainly in the case of the first two species, problems in reproducing females and in the case of *B. ovis*, contagious epididymitis in rams. With the growth of sheep production in Costa Rica, this study discloses the current status of brucellosis in these animals in the country. For this purpose, sera from 510 animals were obtained, belonging to ten farms in eight regions nationwide. These samples underwent testing of Rose Bengal (RB) by two methods, including routine that is used for cattle and the modification suggested by the OIE for sheep. Also, these samples were analyzed using indirect ELISA (ELISAi), competitive ELISA (ELISAc) and fluorescence polarization assay (FPA). Sera from 20 sheep with isolation of *B. melitensis* and 20 sera free of brucellosis were used for validation and performance evaluation of all tests. In addition, three animals that were positive in both ELISA and RB were sacrificed. Isolations compatibles morphologically and biochemically with *Brucella* spp. were obtained, however, molecular characterization, immunohistochemistry and direct immunofluorescence demonstrated that these isolates did not belonged to the *Brucella* genus. Overall, the seroprevalence against *Brucella* antigens in sheep at national level obtained is low, as it accounted for 0.2 % to 0.98 % in the population tested, and therefore, should continue to support national producers and establish regulations to protect the national sheep herd and limit the entry of live animals only from countries with prevalence equal to or less than those described for Costa Rica.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTO	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vii
ÍNDICE DE CUADROS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.1.1. Definición.....	1
1.1.2. Etiología	1
1.1.3. Patogénesis	2
1.1.4. Transmisión.....	3
1.1.5. Brucelosis ovina	3
1.1.6. Zoonosis	5

1.1.7. Diagnóstico.....	5
1.2. Justificación.....	10
1.3. Hipótesis.....	12
1.4. Objetivos.....	13
1.4.1. General.....	13
1.4.2. Específicos.....	13
2. METODOLOGÍA.....	14
2.1. Recopilación de datos de productores.....	14
2.2. Muestreo.....	15
2.2.1. Tamaño de la muestra total.....	15
2.2.2. Selección de fincas y cálculo de sus respectivas muestras.....	15
2.2.3. Selección de animales.....	19
2.2.4. Toma de las muestras.....	20
2.3. Procesamiento de muestras y pruebas de diagnóstico serológicas.....	20
2.3.1. Doble inmunodifusión en gel de agar.....	21
2.3.2. Rosa de Bengala (RB).....	21

2.3.3.	Prueba de fluorescencia polarizada (FPA).....	22
2.3.4.	ELISA indirecto (ELISAi)	23
2.3.5.	ELISA competitivo (ELISAc).....	24
2.4.	Banco de sueros	26
2.5.	Necropsia, cultivo, inmunohistoquímica y caracterización.....	26
2.5.1.	Cultivos bacteriológicos	27
2.5.2.	Inmunofluorescencia directa	28
2.5.3.	Inmunohistoquímica (IHQ).....	28
2.5.4.	Caracterización molecular.....	30
2.6.	Encuestas	31
3.	RESULTADOS.....	33
3.1.	Rosa de Bengala	33
3.2.	Prueba de fluorescencia polarizada	34
3.3.	Elisa indirecto	36
3.4.	ELISA competitivo.....	38
3.5.	Otros datos de los resultados de las pruebas serológicas.....	40

3.6.	Encuestas	48
3.7.	Serología de segundo muestreo	50
3.8.	Cultivos bacteriológicos	52
3.9.	Inmunofluorescencia directa.....	53
3.10.	Inmunohistoquímica	54
3.11.	Caracterización molecular	55
4.	DISCUSIÓN.....	58
5.	CONCLUSIONES	64
6.	RECOMENDACIONES	65
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
8.	ANEXOS.....	75
8.1.	Anexo 1. Encuesta telefónica de brucelosis ovina en Costa Rica	75
8.2.	Anexo 2. Encuesta brucelosis ovina en Costa Rica.....	77

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Estratos de la población ovina de Costa Rica.....	16
Cuadro 2. Fincas seleccionadas y su respectiva muestra.	18
Cuadro 3. Interpretación de resultados de FPA.....	23
Cuadro 4. Interpretación de resultados de ELISAi.....	24
Cuadro 5. Interpretación de resultados de ELISAc.	26
Cuadro 6. Resultados del Rosa de Bengala.	34
Cuadro 7. Resultados de los sueros de referencia utilizados para la validación del FPA.	36
Cuadro 8. Resultados de los sueros de referencia para la validación del ELISAi	38
Cuadro 9. Resultados de los sueros de referencia utilizados para la validación del ELISAc.....	40
Cuadro 10. Combinaciones existentes de resultados de las pruebas serológicas y su respectivo número de individuos de manera exclusiva.....	42
Cuadro 11. Combinaciones existentes de resultados de las pruebas serológicas y su respectivo número de individuos de manera inclusiva.	43
Cuadro 12. Comparación de resultados de Rosa de Bengala 30:30 contra las otras pruebas serológicas realizadas.....	44
Cuadro 13. Comparación de resultados de Rosa de Bengala 75:25 contra las otras pruebas serológicas realizadas.....	45

Cuadro 14. Comparación de resultados de FPA contra las otras pruebas serológicas realizadas.....	46
Cuadro 15. Comparación de resultados de ELISAi contra las otras pruebas serológicas realizadas.....	47
Cuadro 16. Comparación de resultados de ELISAc contra las otras pruebas serológicas realizadas.....	48
Cuadro 17. Presencia de factores de riesgo y de protección para la infección por <i>Brucella</i> spp. en las fincas analizadas.	49
Cuadro 18. Resultados de sueros positivos en al menos alguna prueba, de los animales sangrados en el segundo muestreo a la Finca 6.	51
Cuadro 19. Resultados de los cultivos bacteriológicos.	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de distribución de las fincas analizadas (puntos azules).....	19
Figura 2. Resultados de FPA de las 127 muestras analizadas.	35
Figura 3. Resultados de ELISAi de las 510 muestras de la investigación.....	37
Figura 4. Resultados de ELISAc de las 510 muestras de la investigación.	39
Figura 5. Mapa de distribución de las fincas analizadas y la presencia o no en las mismas de animales seropositivos según las técnicas de diagnóstico utilizadas.....	41
Figura 6. Fotografía de cocobacilos Gram negativos del aislamiento bacteriano obtenido de los linfonodos submandibulares de la oveja 1.	53
Figura 7. Fotografías de: a. Control positivo utilizado en la inmunofluorescencia directa, correspondiente a aislamiento de <i>Brucella ceti</i> . b. Inmunofluorescencia directa negativa del aislamiento bacteriano obtenido de los linfonodos submandibulares de la oveja 1.....	54
Figura 8. Fotografías de: a. Control positivo utilizado en la IHQ, correspondiente a placenta de bovino. b. IHQ negativa de linfonodo submandibular de la oveja 1.	55
Figura 9. Curvas de amplificación de <i>Bcsp31</i> obtenidas de los aislamientos bacterianos de la oveja sacrificada 1..	56
Figura 10. Curvas de amplificación de <i>Bcsp31</i> obtenidas de los aislamientos bacterianos de las ovejas sacrificadas 2 y 3.....	56
Figura 11. Patrones de bandas para las distintas especies de <i>Brucella</i> en el PCR múltiple Bruce-ladder..	57

Figura 12. Patrones de bandas obtenidos con el PCR múltiple Bruce-ladder

a partir de los aislamientos bacterianos de las ovejas sacrificadas.....57

LISTA DE ABREVIATURAS

ASOOVIAMCO	Asociación Ovicaprina Ambientalista Costarricense
DDG	Doble inmunodifusión en gel de agar
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
ELISAc	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas competitivo
ELISAi	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas indirecto
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FC	Prueba de la fijación del complemento
FPA	Prueba de fluorescencia polarizada
IHQ	Inmunohistoquímica
LPS	Lipopolisacárido
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PIET	Programa de Investigación en Enfermedades Tropicales
RB	Rosa de Bengala
SENASA	Servicio Nacional de Salud Animal
SIREA	Sistema Integrado de Registro de Establecimientos Agropecuarios
TBST	Tris-solución salina tamponada con Tween

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

1.1.1. Definición

La brucelosis es una enfermedad causada por bacterias del género *Brucella*, éstas son capaces de afectar a un amplio espectro de mamíferos, tanto silvestres como domésticos, pero principalmente, a estos últimos y al ser humano (Núñez et al., 1997; Moreno y Moriyón, 2002; Blasco, 2004). Las bacterias pertenecientes a este género provocan importantes pérdidas en los animales de producción, y además constituyen una de las zoonosis más importantes en el mundo, por lo que también posee potencial bioterrorista (Crespo, 1994; Moreno y Moriyón, 2002; FAO et al., 2006).

1.1.2. Etiología

Estas bacterias son pequeños cocobacilos inmóviles, intracelulares facultativos, aeróbicos, Gram negativos, todas son parásitos estrictos de los mamíferos, con predilección por órganos ricos en eritritol, tales como los sistemas fagocítico mononuclear y reproductor (Pugh, 2002; Carter y Wise, 2004; Tortora et al., 2007).

Hasta hoy se reconocen diez especies en este género: *Brucella abortus* (afecta principalmente a bovinos), *B. suis* (afecta cerdos), *B. melitensis* (considerada específica de caprinos, pero puede afectar bovinos, ovinos y otros mamíferos), *B. canis* (afecta perros), *B. ovis* (afecta ovinos), *B. neotomae* (afecta ratas del desierto) (Pugh, 2002; Blasco, 2004; Carter y Wise, 2004), *B. pinnipedialis* (afecta pinnípedos tales como focas, leones marinos y morsas),

B. ceti (afecta cetáceos incluyendo delfines, ballenas y marsopas) (Foster et al., 2007), *B. microti* (roedores) y *B. inopinata*. Esta última se considera la especie más recientemente incluida en dicho género y se desconoce su reservorio natural; sin embargo, se ha aislado de implantes de seno de una mujer y de otro paciente con una infección pulmonar (De et al., 2008; Scholz et al., 2008).

Si bien existe cierta especificidad entre las especies de *Brucella* y sus huéspedes naturales, se sabe que algunas de ellas tienen la capacidad para producir, ocasionalmente, infecciones en individuos de otras especies de mamíferos que no corresponden a su huésped habitual, pero que sí han estado en contacto con estos últimos (Núñez et al., 1997; Blasco, 2004).

1.1.3. Patogénesis

Al ingresar a su hospedero, *Brucella* puede ser fagocitada por las células dendríticas, los polimorfonucleares y los macrófagos, como parte de la inmunidad innata. Sin embargo, una vez dentro de macrófagos y células dendríticas, las bacterias son capaces de sobrevivir y multiplicarse en el retículo endoplasmático, debido a que manipulan el tráfico intracelular, de manera que previene la evolución del endosoma temprano a endosomas tardíos y a lisosomas. El fagocito migra por vía linfática a los ganglios regionales correspondientes, pasando luego al torrente sanguíneo, con lo cual se desarrolla una bacteremia y la consecuente diseminación del patógeno en todo el hospedero (Edmonds et al., 2001).

1.1.4. Transmisión

En la transmisión de animal a animal, las vías de infección son diversas, pero la más frecuente es por ingestión de material contaminado después de un aborto o parto de alguna hembra infectada, debido a que se elimina gran cantidad de bacterias a través del feto, membranas fetales y secreciones uterinas (Songer y Post, 2005). Además, la excreción de *Brucella* también puede darse en las secreciones de la ubre y en el semen (OIE, 2012).

1.1.5. Brucelosis ovina

La brucelosis en ovinos puede ser causada por *B. ovis* que se caracteriza por ser rugosa, y por las brucelas lisas *B. abortus* y *B. melitensis* (Carter y Wise, 2004). Todas estas especies pueden producir abortos y alteraciones testiculares como epididimitis u orquitis (Méndez et al., 1999).

Las brucelas lisas afectan sobre todo a hembras adultas, quienes excretan el microorganismo por muchos meses y su infección se caracteriza por la producción de aborto en el último tercio de gestación, retención placentaria, infertilidad y aumento en la mortalidad perinatal. En ocasiones poco frecuentes se da infección a nivel articular, a diferencia de ésta, la colonización de glándula mamaria es común, lo que resulta en una pobre producción láctea, y a la vez la leche se convierte en recurso potencial para la infección a humanos. Los carneros son más resistentes, y cuando se afectan las lesiones suelen ser limitadas solo al aparato reproductor, presentando ocasionalmente orquitis (Núñez et al., 1997; Scott, 2006; Noyma et al., 2009; OIE, 2012).

Respecto a *B. ovis*, las hembras pocas veces se afectan por esta bacteria, en cuyos casos pueden presentar aborto; no obstante, su mayor importancia es epidemiológica al poder diseminar la enfermedad a sus crías (Méndez et al., 1999); esto porque la bacteria afecta principalmente a los machos, a quienes causa la epididimitis contagiosa del carnero, con lesiones como orquitis y epididimitis (si bien *B. abortus* y *B. melitensis* pueden causar esto, la capacidad de *B. ovis* es mayor), siendo el incremento de tamaño del epidídimo (unilateral en la mayoría de casos) el signo más común, y causal de infertilidad (Ficapal, 1993; Núñez et al., 1997).

Esto porque cuando *B. ovis* se establece en los epididímos genera hiperplasia y un proceso de metaplasia del epitelio de los túbulos epididimarios, lo que conlleva a formar vesículas intraepiteliales; estos cambios epiteliales conducen a la extravasación de espermatozoides al intersticio, lo que causa una reacción inflamatoria y formación de granulomas espermáticos, en respuesta a los espermatozoides lisados que liberan ácido micólico, con lo que se provoca una reacción inflamatoria que se caracteriza por edema perivascular e infiltración del tejido conectivo (Robles, 2008).

Las principales vías de infección de esta bacteria en animales adultos es venérea y el contacto sexual entre machos. La epididimitis asociada a *B. ovis* se da en machos adultos, en los corderos que no se han utilizado como sementales se asocia sobre todo a *Actinobacillus seminis* e *Histophilus ovis*; sin embargo, estos agentes también pueden afectar los machos adultos (Méndez et al., 1999).

1.1.6. Zoonosis

No existen reportes de que *B. ovis* afecte al ser humano (Méndez et al., 1999), por lo que esta especie, junto con *B. neotomae* y *B. microti*, constituyen excepciones dentro del género, ya que las demás especies se han reportado como agentes zoonóticos (Blasco, 2004), principalmente *B. melitensis*, seguido por *B. abortus* (Godfroid et al., 2005).

El humano se infecta por contacto directo con animales infectados, principalmente por vía de las mucosas conjuntival u oronasal, o de forma indirecta por ingestión de productos de origen animal contaminados (leche y sus derivados) (Moreno y Moriyón, 2006). La brucelosis en humanos es una enfermedad profesional, en la que ganaderos, carniceros, veterinarios y laboratoristas tienen mayor riesgo de infectarse (Blasco, 2004; FAO et al., 2006). Es caracterizada por fiebres recurrentes y manifestaciones muy variadas como dolores articulares, sudoraciones, anorexia, pérdida de peso y meningitis (Sohn et al., 2003).

1.1.7. Diagnóstico

Para diagnosticar la presencia de *Brucella* mediante la puesta en evidencia de sus antígenos (métodos directos) existen diferentes técnicas laboratoriales, entre ellas, tinciones e inmunofluorescencia de improntas o frotis de productos de abortos o exudados vaginales que permiten la observación de su morfología, cultivos en medios normales o selectivos de exudados uterinos, fetos abortados, secreciones de las ubres o tejidos como ganglios linfáticos, órganos reproductores y semen, o bien la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e inmunohistoquímica (IHQ) como métodos complementarios.

Así mismo, existen otras técnicas que permiten detectar los anticuerpos séricos (métodos indirectos) como la prueba Rosa de Bengala (Prueba del antígeno tamponado de *Brucella*), la prueba de la fijación del complemento (FC), doble inmunodifusión en gel de agar (DDG), ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas o enzimoimmunoensayos (ELISA) (Crespo, 1994; Robles, 1998) y la prueba de fluorescencia polarizada (FPA) (OIE, 2012).

Los métodos basados en la PCR son muy útiles para identificar el antígeno, lo cual se logra al reconocer fragmentos de ácido nucleico de las bacterias, y han avanzado de manera que han mejorado su sensibilidad, especificidad y facilidad técnica (Ling y Nielsen, 2010).

La inmunohistoquímica es una técnica sensible y específica que detecta el antígeno de *Brucella*. Al hacer uso de la misma es posible detectar la bacteria en el citoplasma de células inflamatorias, en especial de los neutrófilos y macrófagos de los tejidos fijados (Nasruddin et al., 2014).

La técnica utilizada más comúnmente es la de estreptavidina-biotina, pero hoy día empieza a tomar auge un sistema que aumenta mucho la sensibilidad y elimina la aparición de falsos positivos por la biotina endógena de los tejidos, se basa en la utilización del dextrano, un polímero de alto peso molecular, al que se conjugan un gran número de moléculas de enzima y de anticuerpo secundario (Pardo et al., 1998).

Entre las técnicas de diagnóstico serológico más tradicionales se encuentra la prueba de Rosa de Bengala (RB); en la que se somete el suero por evaluar a una solución de antígeno brucelar y se observa como las bacterias se aglutinan por el efecto de los anticuerpos del suero

positivo; por lo que es útil para evidenciar exposición a la bacteria (Jiménez, 2013). Esta prueba tiene una sensibilidad de 81.2 % y una especificidad de 86.3 %, siendo muy útil en el análisis preliminar para la detección de hatos infectados, o bien garantizar la ausencia de infección en hatos libres (Crespo, 1994; Gall y Nielsen, 2004).

Con el fin de aumentar la sensibilidad la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y la Unión Europea recomienda utilizar 75 μ L de suero y 25 μ L de antígeno, en lugar del método tradicional que utiliza volúmenes iguales (SCAHAW, 2001; OIE, 2012). Se debe considerar que esta técnica no es útil para *B. ovis*, porque al ser del tipo rugoso no tiene la habilidad de formar suspensiones estables y por ende las pruebas basadas en aglutinaciones no son útiles, recomendándose su uso, principalmente, solo para las brucelas lisas (Alton et al., 1988; Moriyón y Gamazo, 1990).

La doble inmunodifusión en gel de agar (DDG) ha sido muy utilizada para la detección de anticuerpos contra antígenos de *B. ovis*, con diversos procedimientos y resultados, pero cuando la prueba se estandariza con una concentración adecuada de cloruro de sodio en el gel y un antígeno apropiado, ésta es muy sensible y específica (Marín et al., 1989).

El uso de ELISA, tanto indirecto como competitivo, ha brindado buenos resultados diagnósticos, con ventajas como requerir una cantidad mínima de antígeno, los reactivos suelen ser más estables y es capaz de detectar cualquier tipo de inmunoglobulina dependiendo del conjugado utilizado, además poseen altas sensibilidades y especificidades, con valores respectivamente de 96 % y 93.8 % para el ELISA indirecto (ELISAI), y de 97.7 % y 90.5 %

para el ELISA competitivo (ELISAc) (Rahaley et al., 1983; Ris et al., 1984; Gall y Nielsen, 2004; OIE, 2012).

El ELISAi se basa en la detección de anticuerpos contra el LPS (lipopolisacárido), molécula situada en la membrana externa de la *Brucella*, altamente inmunogénica y anfipática, siendo la porción de azúcares hidrofílica y el lípido A hidrofóbico, esta última porción es la que permite al LPS adherirse a las superficies plásticas de los platos de ELISA, para ser posteriormente detectado por los anticuerpos específicos de los sueros de animales infectados, los cuales se unen con alta afinidad a la cadena O del LPS (estructura antigénica más expuesta de *Brucella*).

Esos anticuerpos unidos al LPS son detectados por anti-anticuerpos anti-LPS de *Brucella* conjugados con una enzima (peroxidasa), la unión de estos segundos anticuerpos es proporcional a la cantidad del primer anticuerpo ligado al LPS. Finalmente, por medio de una reacción enzimática en la que un sustrato incoloro (solución de revelación) se transforma a coloreado, cuya densidad óptica es medida con un espectrofotómetro, se determina la presencia de anticuerpos, siendo la intensidad de color proporcional a la cantidad de anticuerpos unidos (Moreno, 2004; Hernández, 2006; Rivers et al., 2006).

En el ELISAc, el LPS es expuesto tanto a suero del animal por diagnosticar, como a anticuerpo monoclonal de ratón específico para un epítipo de la cadena O del LPS. Si el suero posee anticuerpos contra el LPS de *Brucella*, estos compiten contra los anticuerpos de ratón y se unen al LPS, en ausencia de anticuerpos anti-LPS de *Brucella*, son los anticuerpos

monoclonales de ratón los que se ligan al LPS. Posteriormente, se añade anticuerpo de cabra contra anticuerpo monoclonal de ratón conjugado con enzima peroxidasa, la unión de conjugado a anticuerpo de ratón es proporcional a la cantidad de este último unido a LPS, por ende, inversamente proporcional a la presencia de anticuerpos anti-LPS de *Brucella*.

Luego de estas reacciones se agrega una solución sustrato que efectuará un cambio en la coloración de acuerdo a la cantidad del complejo antígeno-anticuerpo-conjugado, el cual es determinado por espectrofotometría. En esta prueba, los sueros de animales positivos no generarán cambio de color, o éste será mínimo (SENASA, 2009).

La prueba de fluorescencia polarizada (FPA) es una técnica sencilla que mide la interacción antígeno-anticuerpo, posee una sensibilidad de 97.5 % y una especificidad de 98.9 %. Está basada en la rotación al azar de las moléculas en solución, siendo el tamaño de las mismas el principal factor que determina la velocidad (inversamente). Para esto se marca un antígeno de bajo peso molecular con un fluorocromo, y se añade a suero, si hay presencia de anticuerpos su unión al antígeno marcado descenderá la velocidad de rotación, lo cual se determina con la medición de la intensidad de luz polarizada en planos verticales y horizontales, debido a que una molécula grande emite más luz en un plano determinado (más polarizada) que una de tamaño pequeño, la cual rota más rápido y emite más luz despolarizada (Gall y Nielsen, 2004; OIE, 2012).

1.2. Justificación

Actualmente, tanto a nivel nacional como en otros países de la región, se está dando un auge en la ovinocultura por los beneficios que ésta representa con respecto a otros tipos de producción animal. Entre ellos, la posibilidad de una explotación silvopastoril muy eficiente, con ventajas como aumento de la fertilidad de la tierra, control del crecimiento del forraje, reducción de uso de herbicidas, más fácil gestión de cosecha, aumento de los rendimientos de los cultivos, incluyendo obviamente la venta de animales y sus productos. Dichas ventajas van de la mano con objetivos de suma importancia de la producción animal en países en desarrollo, tales como la maximización de la producción de alimentos y la generación de ingresos en efectivo adicionales (Devendra, 2011).

Si bien, en el país, empieza a existir un mayor mercado para el consumo de productos y subproductos de estos animales, comercializándose algunos de ellos en restaurantes y supermercados, muchos se manejan de manera local y rústica sin ningún tipo de manejo adecuado, esto porque lo más común es que los sistemas de explotación ovina sean actividades secundarias o para consumo propio en actividades familiares o festejos populares como topes o cabalgatas (Montero et al., 2006; D. Montero, comunicación personal, 02 de Abril 2014).

Se sabe que en Costa Rica existe una gran movilización de los ovinos de un hato a otro, sin ningún tipo de control, pruebas o cuarentenas en la mayoría de casos, lo que facilita la rápida y fácil diseminación de cualquier enfermedad, a la vez que se carecía de registros a nivel nacional de la ubicación de gran parte de los establecimientos (los cuales en su mayoría funcionan con escasas o nulas medidas de bioseguridad ni asesoría veterinaria y prácticamente

la aplicación de tecnología es nula), así como se desconocía un número real aproximado a la población ovina actual (Montero et al., 2006; D. Montero, comunicación personal, 02 de Abril 2014).

Además, a pesar de la presencia de *B. melitensis* en países de la región centroamericana (Moreno, 2002), hasta la fecha de este estudio, en Costa Rica no se había realizado ninguna investigación que describiera la brucelosis en el hato ovino nacional. Por lo tanto, se desconocía todo respecto al estado de la enfermedad en los ovinos del país, incluyendo *B. abortus*, *B. melitensis* o *B. ovis*.

Por otro lado, el Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA) como autoridad de sanidad debe poseer información de referencia ante organismos internacionales como la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal), y esta información debe servir de precedente para aceptar o negar la importación de animales vivos procedentes de países de la región con reconocidos problemas con las especies de bacterias del género *Brucella* más patógenas para los seres humanos.

Por las razones expuestas, se justificaba la realización del presente estudio que permitió estimar la situación sanitaria de estos animales con respecto a brucelosis, para establecer las posibles estrategias sanitarias con respecto a esta enfermedad zoonótica, investigación que en su proceso también permitió conocer algunos aspectos esenciales de la bioseguridad con que se están manejando los hatos ovinos de mayor tamaño y proveedores de pie de cría, así como obtener un aproximado de la población y registrar la ubicación de una buena parte de estos

establecimientos, lo cual también sirve de precedente y será de gran utilidad para cualquier otro estudio en esta población del país.

Todos estos datos serán de vital importancia para el Programa Nacional de Salud en Rumiantes Menores del SENASA, debido a que permitirán la implementación de una correcta estrategia sanitaria con respecto a la enfermedad, lo cual contribuirá a mejorar los índices reproductivos y productivos, así como a garantizar al consumidor seguridad sanitaria en los alimentos de origen ovino que consume.

1.3. Hipótesis

H₀: En el hato ovino del país existen animales seropositivos contra antígenos de *Brucella* spp. en una prevalencia mayor a 1 %.

1.4. Objetivos

1.4.1. General

Realizar un estudio epidemiológico de base para establecer la presencia o ausencia de animales seropositivos contra antígenos de *B. abortus*, *B. melitensis* o *B. ovis* en el hato ovino de Costa Rica.

1.4.2. Específicos

- 1.4.2.1. Generar información sobre la población ovina y del estado actual de la brucelosis ovina en Costa Rica que aporte en la toma de medidas sanitarias que debe adoptar el país respecto a esta enfermedad.
- 1.4.2.2. Determinar la presencia o ausencia de anticuerpos contra antígenos de brucelas lisas en ovinos a nivel nacional.
- 1.4.2.3. Identificar presencia de anticuerpos contra antígenos de *Brucella ovis* a través de doble inmunodifusión en gel de agar, en caso de carneros con sintomatología compatible.
- 1.4.2.4. Aislar *Brucella* spp. de individuos seropositivos, clasificarla y confirmar su presencia a través de técnicas de inmunohistoquímica.
- 1.4.2.5. Conformar un banco de sueros de ovinos del país, que será de utilidad para realizar estudios posteriores sobre agentes infecciosos en ovinos.

2. METODOLOGÍA

2.1. Recopilación de datos de productores.

Mediante la aplicación de una encuesta telefónica a ovinocultores, se logró contabilizar 164 hatos ovinos y 12 358 animales en el país. Estos contactos se obtuvieron de bases de datos de ASOOVIAMCO (Asociación Ovicaprina Ambientalista Costarricense), Regionales del SENASA, SIREA (Sistema Integrado de Registro de Establecimientos Agropecuarios), Médicos Veterinarios, y de los mismos productores que nos facilitaban la información de otros. En esta encuesta se consultó (ver Anexo 1):

- a. Propietario de la explotación
- b. Número telefónico del propietario
- c. Ubicación de la finca.
- d. Población ovina.
- e. Historia clínica (factores de riesgo presentes asociados a la presencia de *Brucella* spp.).

2.2. Muestreo

2.2.1. *Tamaño de la muestra total*

El tamaño de la muestra fue de 510 animales, cantidad ligeramente mayor a la calculada de 489, correspondiente a la necesaria para un estudio de detección de enfermedad (en este caso detección de anticuerpos para la misma), con una confianza de 95 % y prevalencia mínima esperada de 0.6 %, según la fórmula de Cannon y Roe (1982), la cual se presenta a continuación:

$$n = (1 - (1 - P)^{1/d}) \times \left(N - \frac{(d-1)}{2} \right)$$

Donde:

n= tamaño de la muestra

N= tamaño de la población

P= nivel de confianza

d= número de casos detectables en la población

2.2.2. *Selección de fincas y cálculo de sus respectivas muestras*

Para la selección de las fincas, todas las que se lograron encuestar se dividieron en tres estratos, tal como lo representa el Cuadro 1.

Cuadro 1. Estratos de la población ovina de Costa Rica.

Estrato	Definición	Población	N° de hatos
a. Hatos elite	Proveedores de pie de cría. Poblaciones mayores o iguales a 150 individuos	6 200	22
b. Hatos medianos	Proveedores de cría en forma eventual. Poblaciones inferiores a 150 ovejas y mayores o iguales a 60	3 577	37
c. Hatos pequeños	Poblaciones con menos de 60 animales	2 691	105

Se considera que el hato ovino nacional tiene características homogéneas respecto a su bioseguridad y manejo, es sumamente común el trasiego de animales de una finca a otra sin importar el tamaño de éstas, todos esos movimientos suelen realizarse sin ninguna prueba de por medio para detección de alguna enfermedad ni la ejecución de cuarentenas, así mismo, indiferente a la población ovina de las producciones, es frecuente encontrar en algunas de ellas el convivio con otras especies, en especial bovinos (Montero et al., 2006; D. Montero, comunicación personal, 02 de Abril 2014). Por eso, se consideró que al muestrear una proporción de fincas, seleccionadas al azar y distribuidas en todo el país, el resultado de ellas en su conjunto sería una buena representación de lo que vive el hato en el territorio nacional.

A pesar de esa homogeneidad mencionada, se escogieron aleatoriamente producciones ovinas de los primeros dos estratos (a y b), que en buena medida reflejan lo que viven las demás, esto porque las fincas más grandes son las que normalmente proveen el pie de cría a las otras, así que las producciones de pequeña magnitud en general presentan el mismo estado sanitario a las de mayor tamaño.

A cada uno de estos dos estratos se les estableció una muestra proporcional a la población con la que cuenta. Luego, se procedió a seleccionar, de manera aleatoria, finca por finca. Para este propósito se ordenaron por región (de acuerdo a regionalización utilizada por el SENASA) de manera alfabética por el nombre del propietario, se les asignó un número consecutivo y posterior a esto se escogieron utilizando la función aleatorio de Microsoft Excel.

Cada vez que se eligió una finca, se calculaba su muestra de acuerdo a la cantidad necesaria para un estudio de detección de enfermedad, con una confianza de 95 % y prevalencia esperada de 5 %, según la fórmula de Cannon y Roe (1982).

Así se seleccionó establecimiento tras otro, de manera que se iba reduciendo la cantidad de animales faltantes para completar la cantidad necesaria en el estrato que se estaba calculando, hasta haber completado la muestra, de tal manera que la selección quedó establecida tal como lo muestra el Cuadro 2 (en algunas fincas la muestra fue ligeramente superior a lo obtenido por la fórmula, pero nunca menos) y las fincas distribuidas tal como lo representa la Figura 1.

Cuadro 2. Fincas seleccionadas y su respectiva muestra.

Estrato	Finca	Región	Provincia	Cantón	Distrito	Población	Muestreo
a	1	Central Oriental	Cartago	Cartago	Llano Grande	175	50
	2	Chorotega	Guanacaste	Liberia	Mayorga	237	56
	3	Chorotega	Puntarenas	Puntarenas	Lepanto	600	56
	4	Huetar Atlántica	Limón	Siquirres	La Alegría	340	58
	5	Huetar Norte	Alajuela	San Carlos	Agua Zarcas	235	52
	6	Pacífico Central	Puntarenas	Garabito	Tárcoles	200	50
b	7	Huetar Norte	Heredia	Sarapiquí	Puerto Viejo	146	50
	8	Brunca	San José	Pérez Zeledón	Daniel Flores	147	51
	9	Central Occidental	Alajuela	Atenas	Concepción	138	48
	10	Central Sur	San José	Puriscal	Mercedes Sur	50	39

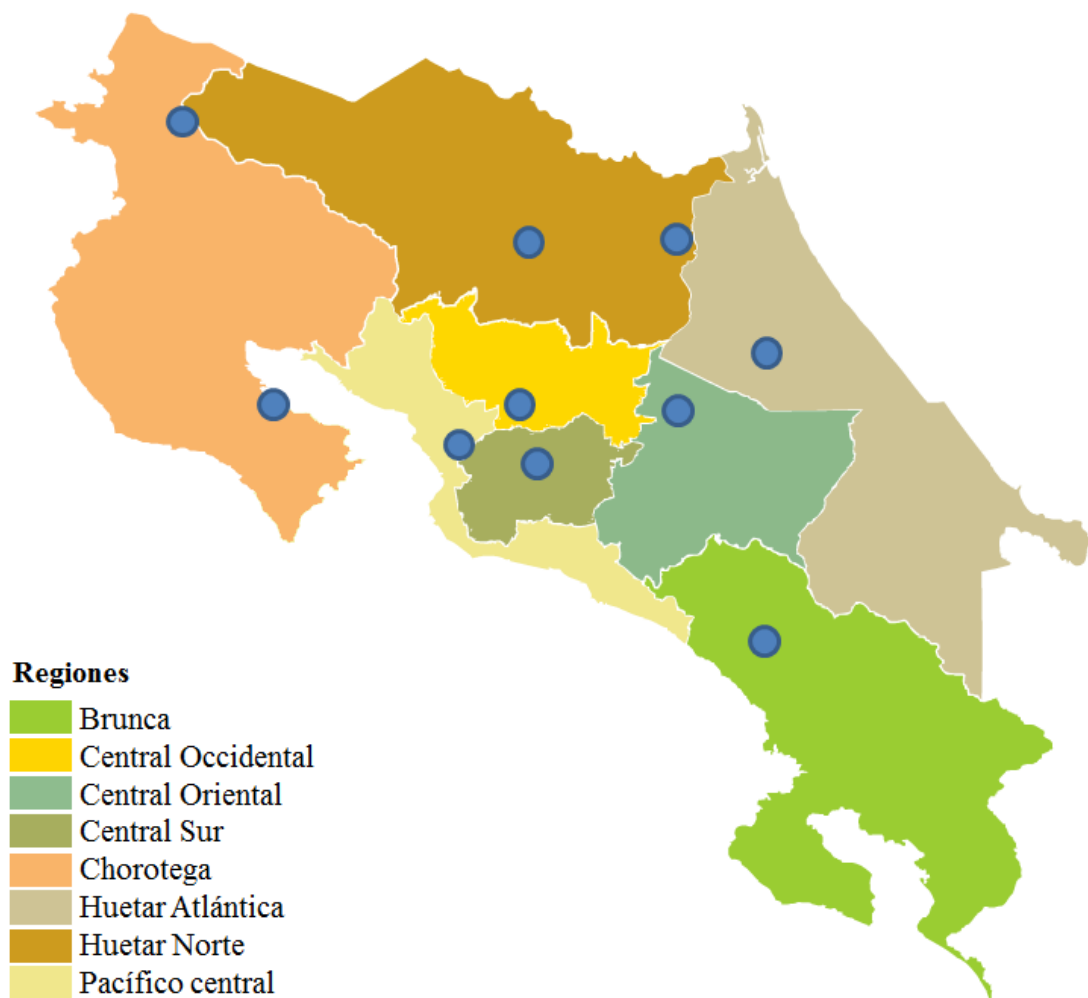


Figura 1. Mapa de distribución de las fincas analizadas (puntos azules).

2.2.3. Selección de animales.

Los animales fueron seleccionados en el mismo momento que se visitaba la finca. Para esto, tras consultar a los encargados del manejo de los ovinos, se dio prioridad a animales con mayor probabilidad de estar infectados por *Brucella* spp., como aquellos con manifestación de

abortos, partos de nacidos débiles o natimueertos, retenciones de placenta, o bien con condiciones que los convirtieran en individuos más susceptibles, tales como baja condición corporal y mucosas pálidas. Posterior a esto, en caso de no cubrir la totalidad de muestra asignada a la explotación, se procedía a escoger animales de manera aleatoria simple entre la población restante.

2.2.4. Toma de las muestras

Una vez escogidas las fincas y calculado el número de muestra en cada una, se realizaron las visitas con el apoyo logístico de las Direcciones Regionales del SENASA. En las visitas se procedía con las respectivas tomas de muestras de sangre vía yugular (previa desinfección de la zona de la punción) de los animales seleccionados. Estas muestras se recolectaron en tubos sin anticoagulante, los cuales se identificaban debidamente con el dato del individuo al que correspondían, y posteriormente, se almacenaban en hieleras con bolsas de gel congelado para mantener la temperatura en un rango de 4°C a 10°C, mientras se realizaba el resto del muestreo y transporte, hasta llegar al Laboratorio de Bacteriología de la Unidad Médico Veterinaria del SENASA, donde se almacenaban en refrigeración (2°C a 6°C).

2.3. Procesamiento de muestras y pruebas de diagnóstico serológicas

Una vez con las muestras en el laboratorio, se procedía con su respectivo procesamiento, lo más rápido posible. El primer paso a realizar fue la centrifugación a 3500 RPM durante

ocho minutos de los tubos con sangre, para así separar el coágulo y obtener el correspondiente suero del animal muestreado.

2.3.1. *Doble inmunodifusión en gel de agar*

Debido a que no se encontraron machos reproductores con orquitis en las visitas a las fincas, esta prueba para buscar anticuerpos contra antígenos de *B. ovis* en los sueros de los carneros no se realizó.

2.3.2. *Rosa de Bengala (RB)*

Con el fin de determinar presencia o ausencia de anticuerpos contra antígenos de brucelas lisas, a la muestra de cada animal se le realizó la prueba RB, tanto con el uso del método tradicional (RB 30:30, volúmenes iguales de suero y antígeno, 30 μ L de cada uno) como con la modificación que sugiere la OIE (RB 75:25, 75 μ L de suero y 25 μ L de antígeno). En ambos casos se colocó la cantidad de suero requerido sobre una placa de vidrio, luego el antígeno, para posteriormente homogenizar las dos sustancias con un palillo de madera (“palillo de dientes”) y esperar que transcurrieran cuatro minutos mientras se observaba la reacción. De acuerdo a la aglutinación observada, se clasificó como leve (al cabo de cuatro minutos la aglutinación es levemente perceptible), moderada (al cabo de cuatro minutos hay aglutinación clara) o fuerte (la aglutinación es franca incluso antes de los dos minutos).

2.3.3. Prueba de fluorescencia polarizada (FPA)

La técnica de FPA se efectuó a los sueros que resultaron positivos en cualquiera de las dos variantes de la técnica RB, junto a algunos negativos (31) y a 20 sueros control negativos como a 20 sueros positivos de distintos ovinos con aislamiento de *B. melitensis*, aportados por la seroteca del PIET (Programa de Investigación en Enfermedades Tropicales), los cuales fueron útiles para la validación de este y otros ensayos del presente trabajo; estos sueros fueron utilizados para estudios anteriores y preservados bajo congelación a -20°C (Marín et al., 1999).

La metodología utilizada fue la recomendada por la casa comercial Diachemix[®] con algunas pequeñas variantes. Se colocó un mililitro de Buffer de reacción (previamente diluido 1:25 en agua desionizada) en tubos de vidrio borosilicato, posteriormente, en tres de estos tubos se agregó 20 μL de control negativo en cada uno, en otro se colocó 20 μL de control positivo y en los demás 20 μL de los sueros a analizar, para luego mezclar e incubar cinco minutos y leer los blancos en el equipo lector para FPA Sentry 200. En seguida, se pipeteó diez microlitros de conjugado en los tubos y se mezclaron con vortex. Después de este paso, el fabricante recomienda hacer la lectura entre dos y 60 minutos, por lo que se optó por hacer mediciones a los dos, 30 y 60 minutos, y obtener un promedio. El resultado se reporta en mP (unidades de milipolarización) y se obtiene al restar el promedio de los controles negativos al valor obtenido por la muestra. La interpretación que se debe dar a los resultados de FPA se muestra en el Cuadro 3. Esta técnica es válida si el promedio de los controles Negativo resulta entre 70 y 95 mP, y el control positivo resulta con valores de 120 y 250 mP.

Cuadro 3. Interpretación de resultados de FPA

Muestra	Resultado
Negativo	<10 mP
Sospechoso	10-20 mP
Positivo	>20 mP

2.3.4. ELISA indirecto (ELISAI)

Para esta prueba, realizada a los sueros de todos los animales muestreados, además de utilizar como controles los suministrados por los kits comerciales, se realizó la prueba a los 20 sueros de ovinos con aislamiento de *B. melitensis* y 20 de animales libres de infección aportados por el PIET.

Los pasos seguidos en la realización de la técnica, fueron los dados por la casa comercial IDVet[®], fabricante del kit utilizado (ID Screen[®] Brucellosis Serum Indirect Multi-species). Primero se distribuyó 190 µL de diluyente 2 en cada pocillo por utilizar en la placa, luego diez microlitros de control negativo en los pocillos A1 y B1, diez microlitros de control positivo en C1 y D1, y diez microlitros de suero de las muestras en investigación en los demás pocillos (cada suero se hizo por duplicado, de manera que el resultado posterior se obtuvo al promediar). Se incubó durante 45 minutos y terminado este tiempo se hicieron tres lavados con aproximadamente 300 µL de solución de lavado (diluida previamente 1:20 en agua destilada). Posteriormente, se añadió 100 µL de conjugado (diluido justo antes de necesitarse 1:10 en diluyente 3) a todos los pocillos, para luego dejarse incubar 30 minutos y lavar tres veces con aproximadamente 300 µL de solución de lavado. De inmediato, se agregó 100 µL

de solución de revelación en cada pocillo, se incubó 15 minutos en oscuridad y se distribuyó 100 μ L de solución de parada, finalmente se leyó la placa con una densidad óptica de 450 nm. La interpretación de los resultados de este ELISA indirecto se representa en el Cuadro 4. Los resultados se obtienen al aplicar la siguiente fórmula:

$$\%S/P = ((DO_{\text{muestra}} - DO_{\text{CN}}) / (DO_{\text{CP}} - DO_{\text{CN}})) \times 100$$

Donde:

DO= densidad óptica

CN= Control negativo

CP= Control positivo

Además, el test es válido si:

a. $DO_{\text{CP}} > 0.350$

b. $DO_{\text{CP}}/DO_{\text{CN}} > 3$

Cuadro 4. Interpretación de resultados de ELISAI

Estatus	Resultado
Negativo	$\%S/P \leq 110\%$
Sospechoso	$110\% < \%S/P < 120\%$
Positivo	$\%S/P \geq 120\%$

2.3.5. ELISA competitivo (ELISAc)

El ELISAc fue utilizado en todos los sueros de los animales muestreados. Al igual que con el FPA y el ELISAI, la prueba se efectuó a los 20 sueros de ovinos positivos a *B. melitensis* y a los 20 de animales libres de infección aportados por el PIET.

La metodología utilizada fue la que recomienda Svanovir[®], fabricante del ELISA utilizado (Brucella-Ab ELISAC). Para empezar se agregó 45 µL del Buffer de dilución para muestras en cada uno de los pocillos a utilizar en la placa. Luego, se añadió por duplicado en pocillos diferentes, cinco microlitros de control positivo, cinco microlitros de control débil positivo, cinco microlitros de control negativo, cinco microlitros más de Buffer (para control conjugado) y cinco microlitros de cada una de las muestras a analizar. Posterior a esto, se distribuyó 50 µL en cada pocillo de la solución con anticuerpos monoclonales de ratón (mAb) y se procedió a agitar la placa durante cinco minutos, para seguidamente incubar 30 minutos. Después se lavó cuatro veces cada pocillo con aproximadamente 250 µL de Buffer PBS (buffer fosfato salino)-Tween, e inmediatamente se agregó 100 µL de conjugado a cada uno, se dejó incubar durante 30 minutos, se volvió a lavar cuatro veces con Buffer PBS-Tween y se distribuyó 100 µL de sustrato a cada pocillo. Luego de transcurridos diez minutos de incubación se añadió 50 µL de solución de parada para proceder a leer la densidad óptica a 450 nm. La interpretación de resultados de este ELISA se muestra en el Cuadro 5. Los resultados se obtienen al hacer uso de la siguiente fórmula:

$$PI = 100 - (DO_{\text{muestra}} / CC \times 100) / (DO_{\text{CC}})$$

Donde:

PI= Porcentaje de inhibición

DO= Densidad óptica

CC= Control conjugado

La prueba es válida si:

- a. $0.75 \leq DO_{\text{CC}} \leq 2.0$
- b. $80 \leq PI \text{ control positivo} \leq 100$
- c. $-10 \leq PI \text{ control negativo} \leq 15$

Cuadro 5. Interpretación de resultados de ELISAc.

Estatus	Resultado
Negativo	< 30%
Positivo	≥ 30%

2.4. Banco de sueros

Luego de la utilización de los sueros para determinar presencia o ausencia de anticuerpos contra antígenos de *Brucella* spp., se procedió a almacenarlos a -20°C con y sin glicerol, con el objetivo de tener una muestra representativa de los sueros de ovinos del país, los cuales podrían ser muy útiles posteriormente en diferentes pruebas diagnósticas y en otras enfermedades sobre las que interese investigar.

2.5. Necropsia, cultivo, inmunohistoquímica y caracterización

Los animales diagnosticados como seropositivos en al menos una de las variantes de RB y ambos ELISAs, fueron seleccionados para realizarles la necropsia respectiva. En un principio solo un animal de la Finca 6 (acorde a Cuadro 2) cumplió con estos valores, por lo que con el fin de hacer una mejor búsqueda de animales infectados, esta producción se volvió a muestrear, aparte que ese único individuo sospechoso fue imposible localizarlo por ausencia de una correcta identificación individual, así que se procedió a sangrar a todos los animales encontrados (120) en la finca durante una segunda visita. Estas muestras fueron analizadas con

RB 30:30 y 75:25, y a las que resultaron con alguna aglutinación se les realizó también FPA, ELISAI y ELISAc.

Durante la necropsia de los tres individuos que cumplían con el perfil serológico descrito anteriormente, se recolectaron muestras de hígado, bazo, glándula mamaria, linfonodos parotídeos, mandibulares, retrofaríngeos, laríngeos, preescapulares, mediastínicos, ilíacos y mamaris, también de un absceso supramamario que presentaba un animal, leche; además, dos de los individuos estaban gestantes por lo que también se tomó placenta, líquido amniótico, pulmón, corazón y riñón de los fetos.

2.5.1. *Cultivos bacteriológicos*

Luego de recolectadas las muestras, se realizaron cultivos en medios no selectivos (agar sangre) y medios selectivos (agar *Columbia*, con 5 % de dextrosa, 5 % de sangre oveja y utilizando Suplemento Brucella SR0209 de Oxoid®). A las colonias sospechosas se les realizó prueba de identificación haciendo uso de tinción Gram y bioquímicas convencionales (urea, nitritos, oxidasa, producción de H₂S) y seroaglutinación con naranja de acridina y acriflavina para establecer si la cepa era rugosa o lisa (Alton et al., 1988).

2.5.2. *Inmunofluorescencia directa*

Se tomó una asada de los cultivos bacteriológicos puros, compatibles con *Brucella* spp. y de un control positivo (*Brucella ceti*), y se colocaron sobre cubreobjetos con 15 µL de agua desionizada y destilada estéril. Luego se dejaron secar a temperatura ambiente para proceder a fijar con 500 µL de paraformaldehído al 3.5 %, y pasados 15 minutos a temperatura ambiente, se eliminó éste para adicionarles 500 µL de una solución de cloruro de amonio (50 mM). Los cubreobjetos se incubaron por diez minutos a temperatura ambiente, luego se lavaron rápidamente dos veces con PBS y una vez con PBS-Tritón al 0.1 %. A continuación se colocaron los cubreobjetos sobre 50 µL de conjugado anti antígeno de *Brucella* FITC en una dilución de 1:150 en PBS con 10 % de suero fetal de caballo y se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se lavaron con las mismas soluciones de los lavados anteriores y los cubreobjetos se colocaron sobre diez microlitros de Mowiol (Merck) en portaobjetos y se dejaron secar durante la noche. El día siguiente las muestras fueron evaluadas bajo un microscopio de fluorescencia (Hernández et al., 2009).

2.5.3. *Inmunohistoquímica (IHQ)*

De los animales sacrificados, se tomó material de los mismos tejidos tomados para cultivo, se colocaron en formalina buferada al 10 %, y luego fueron fijados y parafinados en bloques en el Área de Patología del Departamento de Diagnóstico Veterinario del SENASA. A los tejidos en los que se obtuvo aislamientos bacterianos, previamente cortados y colocados

sobre láminas portaobjetos, se procedió a realizarles la técnica de inmunohistoquímica basada en el sistema de polímeros de dextrano.

Para iniciar con la IHQ, se procedió a desparafinar y rehidratar el tejido, para lo cual las muestras de los tejidos por diagnosticar y de los controles, fueron puestas a 60°C durante 40 minutos, y luego sumergidas por tiempos establecidos en xilol, etanol 100 %, etanol 95 %, etanol 80 % y agua destilada respectivamente. Posteriormente, se bloqueó la peroxidasa endógena (para evitar cambios de coloraciones debidos a esta enzima, lo cual podría generar falsos positivos) colocando las muestras en peróxido de hidrógeno al 3 % durante 30 minutos, y concluido este tiempo se lavaron con agua. El siguiente paso fue el rescate antigénico con solución de rescate y el uso de autoclave (en el caso de *Brucella*, este paso se puede obviar ya que el LPS es estable y el formol no cambia su estructura). Una vez terminado este paso se esperó hasta alcanzar la temperatura ambiente y se lavó con agua destilada. A continuación, se colocaron las láminas en el Cover Plate, se realizaron lavados con TBST (Tris-solución salina tamponada con Tween) y se depositó 100 µL de bloqueador de proteínas (con el fin de evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos en los pasos posteriores), se esperó cinco minutos y se lavó tres veces con TBST. En seguida se pipeteó 100 µL del anticuerpo primario (policlonal de conejo) en una dilución 1:10000 sobre cada muestra, y se dejó de un día para otro a 4°C. Al día siguiente se colocaron las muestras a temperatura ambiente durante una hora y se procedió a realizar tres lavados con TBST. Como siguiente paso se agregó 100 µL de la solución del polímero (contiene polímeros de dextrano conjugados con enzimas y anticuerpos anti-anticuerpo policlonal de conejo), se dejó actuar 30 minutos y se lavó de nuevo tres veces con

TBST. Seguidamente se colocó 100 µL de diaminobencidina (DAB) en cada muestra como agente cromógeno, se esperó cinco minutos y se repitieron lavados con TBST. A continuación, se realizó la contratinción con hematoxilina y luego lavados con agua. Posteriormente, se procedió a deshidratar las muestras, pasándolas por las mismas sustancias utilizadas en la hidratación, pero en sentido contrario (etanol 80 %, etanol 95 %, etanol 100 % y xilol). Finalmente, se colocaron cubreobjetos sobre los portaobjetos con las muestras y se procedió a observar las láminas en el microscopio.

2.5.4. Caracterización molecular

Los aislamientos compatibles bioquímicamente con el género *Brucella*, se enviaron al Programa de Investigación en Enfermedades Tropicales (PIET) de la Universidad Nacional (UNA), para su genotipificación utilizando los primers 5'-GCTCGGTTGCCAATATCAATGC-3', y 5'-GGGTAAAGCGTCGC CAGAAG-3' (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) para la amplificación del gen *Bcsp31*, el cual codifica para una proteína de membrana externa de 31 kDa encontrada en todas las especies de *Brucella* (Sidor et al., 2013).

A los mismos aislamientos también se les realizó el PCR múltiple Bruce-ladder, el cual permite identificar entre especies de *Brucella*. Al analizar por electroforesis, cada especie tiene un patrón distinto de bandas, de acuerdo a la cantidad y tamaño de los fragmentos amplificados. Por lo que junto con la muestra a analizar, la técnica se realiza a un grupo de

controles, los cuales permiten comparar la similitud del patrón de la muestra a los que presentan las distintas especies (López et al., 2011).

2.6. Encuestas

Durante las visitas a las fincas se realizó una encuesta epidemiológica de análisis de factores de riesgo reportados por la literatura para la infección de brucelosis en estos animales.

La información obtenida incluye (Ver Anexo 2):

- a. Características de la finca: Tamaño y sus subáreas con su respectiva dedicación, tipo de infraestructura presente (corral manga, cepo), manejo (pastoreo, semiestabulado, estabulado), uso de heces, límites con áreas de vida silvestre y/o hatos brucelosos.
- b. Población animal: Especificación según edades, sexo y uso de la población ovina, así como presencia de otras especies domésticas y de mamíferos silvestres.
- c. Manejo sanitario y reproductivo: Utilización de servicios veterinarios, forma de servir a las hembras (monta natural o inseminación artificial), aislamiento preparto y posparto, problemas nutricionales y parasitarios.
- d. Reemplazo de ovejas: Cantidad de animales reemplazados anualmente, origen, realización de pruebas de brucelosis previo ingreso, aplicación de cuarentenas.
- e. Plan de vacunación: Tipo de vacuna y frecuencia.

- f. Historia clínica del hato: Abortos, retenciones placentarias, nacidos débiles, natimuertos, manejo de desechos de parto, orquitis, realización de pruebas diagnósticas de brucelosis.

3. RESULTADOS

3.1. Rosa de Bengala

De un total de 510 sueros de diferentes animales analizados, 11 (2.26 %) resultaron positivos en la variante 30:30 de la técnica RB, de esos, siete (63.63 %) se reportaron con aglutinación leve y cuatro (36.36 %) con moderada. En el RB 75:25, 95 animales (18.63 %) dieron positivos, entre ellos, 52 (54.74 %) con aglutinación leve, 36 (37.89 %) con moderada y siete (7.37 %) con fuerte (Cuadro 6). De las muestras positivas en 30:30, todas resultaron como tal en 75:25, con excepción de una, por lo que 96 (18.82 %) es la cantidad de ovinos con serología positiva en RB, indistintamente de la variante utilizada.

Como se aprecia en el Cuadro 6, ninguna muestra resultó positiva fuerte en la dilución 30:30, tres regiones no presentaron casos positivos en este mismo tipo de Rosa de Bengala, pero en el 75:25 todas las regiones presentaron animales reaccionantes.

Cuadro 6. Resultados del Rosa de Bengala.

Regiones	Rosa Bengala 30:30					Rosa Bengala 75:25					Total analizados
	-	+	++	+++	Total positivo	-	+	++	+++	Total positivo	
Brunca	51	0	0	0	0	49	2	0	0	2	51
Central Occidental	48	0	0	0	0	38	3	4	3	10	48
Central Oriental	49	1	0	0	1	44	5	0	1	6	50
Central Sur	39	0	0	0	0	33	6	0	0	6	39
Chorotega	107	4	1	0	5	80	20	12	0	32	112
Huetar Atlántica	55	1	2	0	3	41	8	8	1	17	58
Huetar Norte	101	0	1	0	1	93	5	4	0	9	102
Pacífico Central	49	1	0	0	1	37	3	8	2	13	50
País	499	7	4	0	11	415	52	36	7	95	510
Total positivos en al menos un Rosa Bengala:										96	
-	negativo	+	aglutinación leve	++	aglutinación moderada	+++	aglutinación fuerte				

3.2. Prueba de fluorescencia polarizada

Con la técnica FPA se analizaron 127 muestras de las fincas participantes del estudio, de ellas, 96 correspondían a las que resultaron positivas con RB, más 31 negativas a la misma prueba, seleccionadas aleatoriamente. De todas las 127 analizadas, solamente una resultó

sospechosa (11.4 mP, la cual no correspondía a RB positivo, y procedía de la Finca 7 ubicada en la región Huetar Norte), y las demás negativas (<10 mP), tal como se representa en la Figura 2.

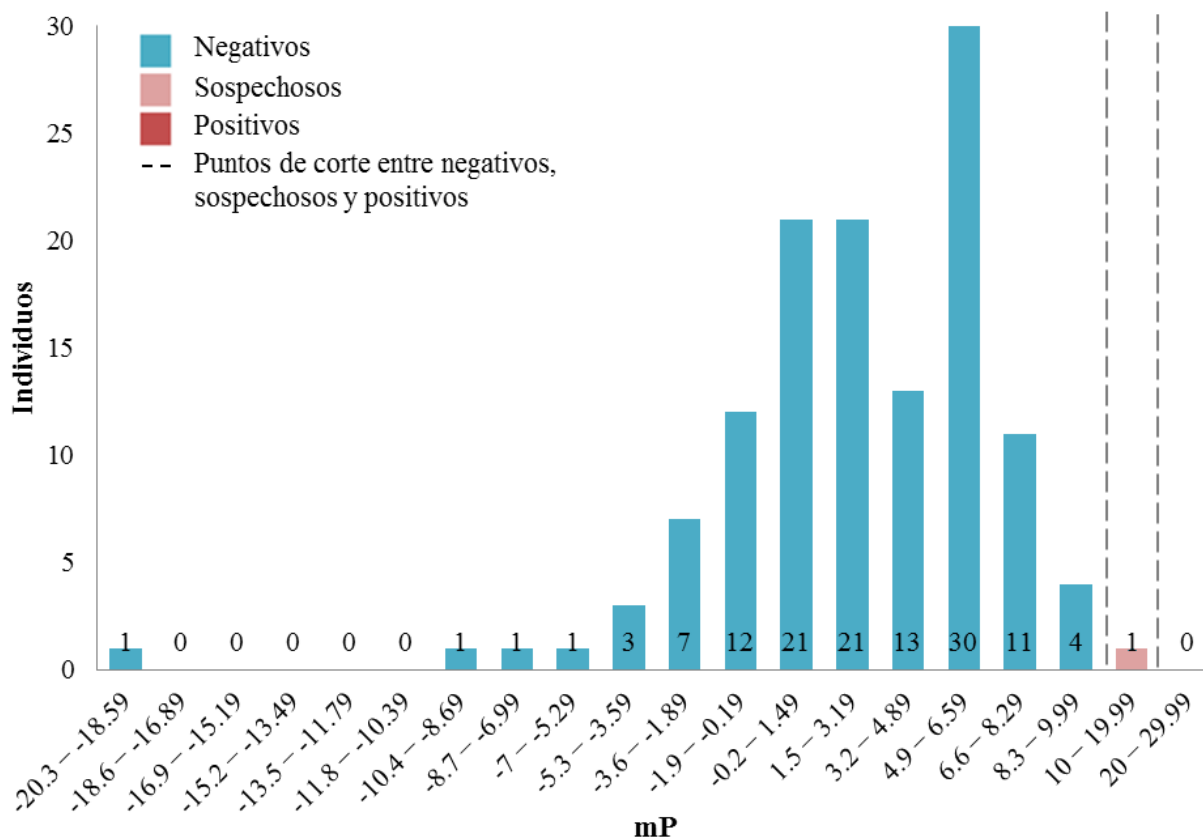


Figura 2. Resultados de FPA de las 127 muestras analizadas.

Respecto a las muestras utilizadas como parte de la validación del FPA, todas las negativas resultaron como tal, pero las positivas, a pesar de todas ser de ovinos con aislamiento de *B. melitensis*, no todas dieron los valores esperados (Cuadro 7). De 20 sueros positivos utilizados, solo 14 (70 %) resultaron así y el resto negativos (30 %).

Cuadro 7. Resultados de los sueros de referencia utilizados para la validación del FPA.

Sueros positivos	Resultado (mP)	Sueros negativos	Resultado (mP)
1	143.2	1	-4.3
2	1.2	2	1.3
3	55.1	3	6.2
4	4.1	4	5.7
5	22.9	5	-1.9
6	-0.7	6	5.4
7	2.3	7	6.2
8	-7.3	8	3.3
9	70.2	9	-0.4
10	110.8	10	3.3
11	62.2	11	5.8
12	130.1	12	3.3
13	46.0	13	3.5
14	135.6	14	8.4
15	204.6	15	-8.6
16	90.7	16	0.9
17	144.9	17	-1.8
18	73.7	18	3.3
19	9.9	19	5.2
20	159.1	20	-5.0

Negativo < 10 mP Sospechoso 10-20 mP Positivo > 20mP

3.3. Elisa indirecto

Con el ELISAI fueron analizados los 510 sueros de la investigación, de los cuales solamente uno resultó positivo (190.7 %S/P), este suero provenía de un animal de la región Pacífico Central (Finca 6). Además, ningún individuo obtuvo valores que lo situaran como sospechoso, por lo que 509 ovinos (99.8 %) resultaron negativos, tal como lo demuestra la Figura 3.

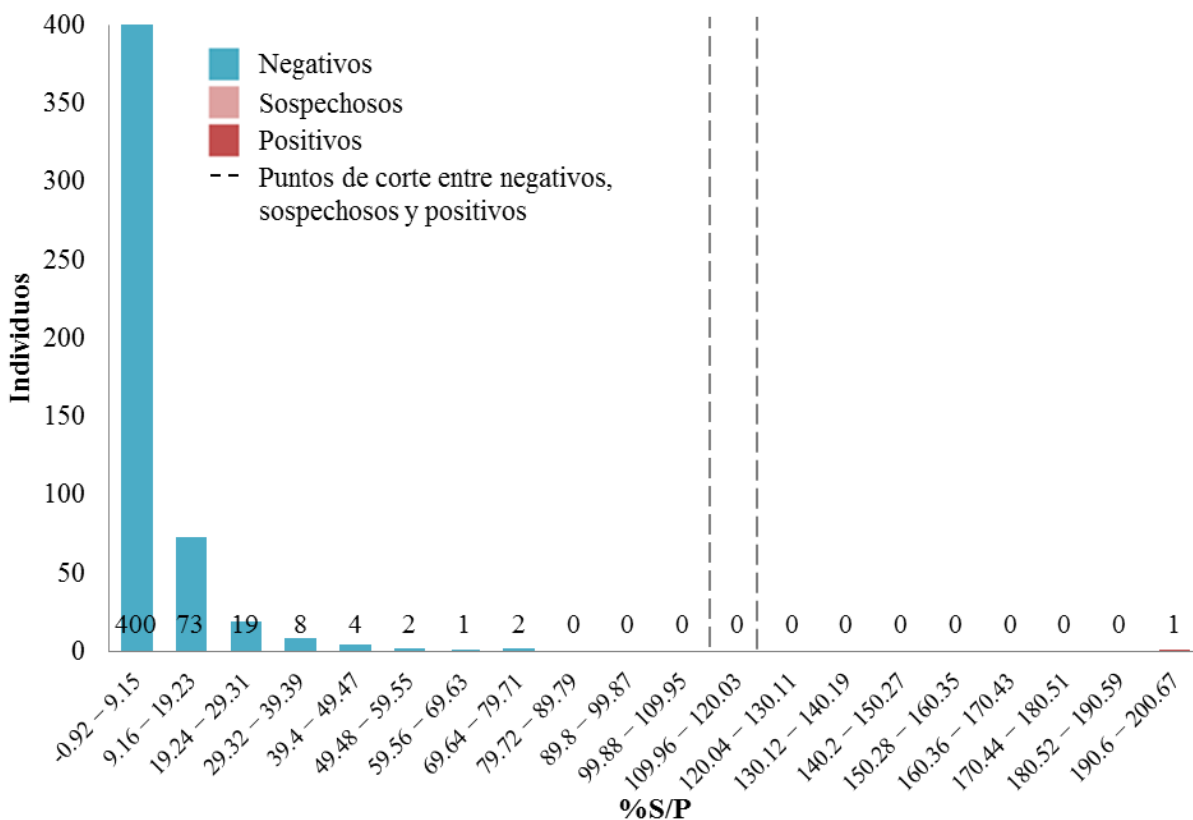


Figura 3. Resultados de ELISAI de las 510 muestras de la investigación.

El Cuadro 8, muestra los resultados de los sueros de referencia utilizados para validación del iELISA en muestras de ovinos, en los cuales se obtuvieron los valores esperados. De todas las muestras pertenecientes a animales con aislamiento de *B. melitensis*, se obtuvo valores por encima al 120 % S/P, mientras que los sueros de negativos resultaron inferior al 110 % S/P.

Cuadro 8. Resultados de los sueros de referencia para la validación del ELISAi

Sueros positivos	Resultado (%S/P)	Sueros negativos	Resultado (%S/P)
1	414	1	19
2	455	2	6
3	343	3	5
4	450	4	7
5	260	5	14
6	327	6	8
7	250	7	9
8	446	8	7
9	455	9	13
10	458	10	11
11	445	11	26
12	467	12	16
13	458	13	7
14	468	14	17
15	455	15	9
16	459	16	3
17	464	17	10
18	448	18	12
19	442	19	11
20	455	20	11

Negativo \leq 110%S/P Sospechoso 110-120%S/P Positivo \geq 120%S/P

3.4. ELISA competitivo

De las 510 muestras de ovinos analizadas mediante ELISAc, cinco (0.98 %) obtuvieron resultados positivos (Figura 4), animales que se distribuyen en las regiones Chorotega, Huetar Norte y Pacífico Central (fincas 3, 4 y 6), y cuyo individuo con el valor más alto de PI (42.1 %) correspondió al único positivo en ELISAi.

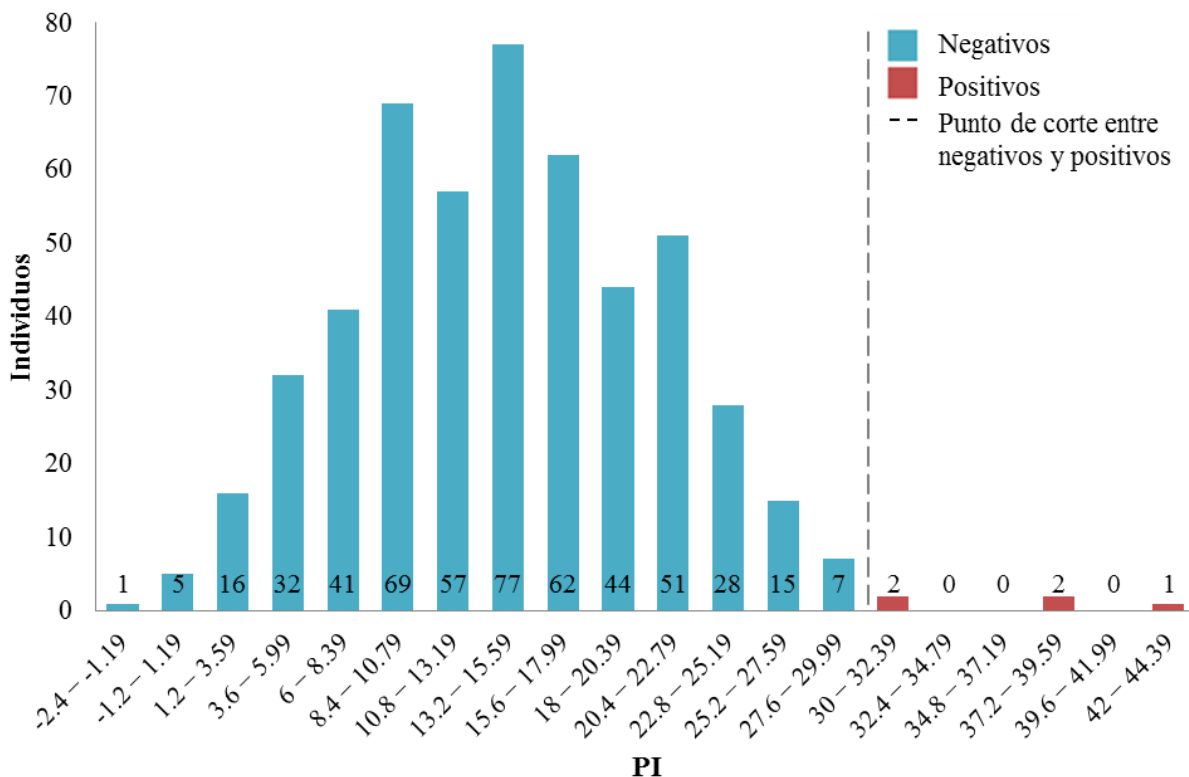


Figura 4. Resultados de ELISAc de las 510 muestras de la investigación.

Respecto a los sueros utilizados como referencia para la validación, al igual que el ELISAi, el ELISAc dio valores acorde a lo esperado, todos los sueros de animales positivos con valores de PI superiores al 30 %, y todos los negativos inferiores a ese mismo número que representa el valor de punto corte (Cuadro 9).

Cuadro 9. Resultados de los sueros de referencia utilizados para la validación del ELISAc.

Sueros positivos	Resultado (PI)	Sueros negativos	Resultado (PI)
1	71.55	1	16.78
2	95.69	2	10.92
3	45.69	3	9.14
4	90.86	4	10.33
5	85.92	5	15.04
6	94.99	6	13.98
7	50.61	7	10.36
8	76.14	8	14.26
9	94.91	9	12.52
10	95.32	10	13.93
11	93.65	11	13.22
12	96.68	12	12.48
13	73.22	13	7.06
14	90.67	14	12.31
15	96.33	15	10.20
16	94.92	16	7.08
17	90.81	17	4.77
18	93.61	18	17.42
19	88.89	19	14.21
20	95.62	20	13.75

Negativo <30 PI Positivo ≥ 30 PI

3.5. Otros datos de los resultados de las pruebas serológicas

Al revisar los resultados de las cinco técnicas de diagnóstico en las diez fincas analizadas, se detecta que solo una explotación obtuvo resultados positivos en cuatro pruebas distintas (Finca 6, perteneciente a Pacífico Central). Por el contrario, cuatro fincas únicamente obtuvieron resultados de animales positivos en RB 75:25 (fincas 2, 8, 9 y 10, localizadas respectivamente en las regiones Chorotega, Brunca, Central Occidental y Central Sur), así

mismo un establecimiento, además del RB 75:25, solo obtuvo un individuo sospechoso en FPA (Finca 7, ubicada en Huetar Norte). En dos fincas se dio el caso de presentar seropositividad en dos técnicas, que correspondió a ambos RB (Finca 5 de Huetar Norte y Finca 1 de Central Occidental). Además, en dos explotaciones se obtuvo resultados positivos con tres técnicas, pertenecientes a ambos RB y al ELISAc (Finca 3 de Chorotega y Finca 4 de Huetar Atlántica) (Figura 5).

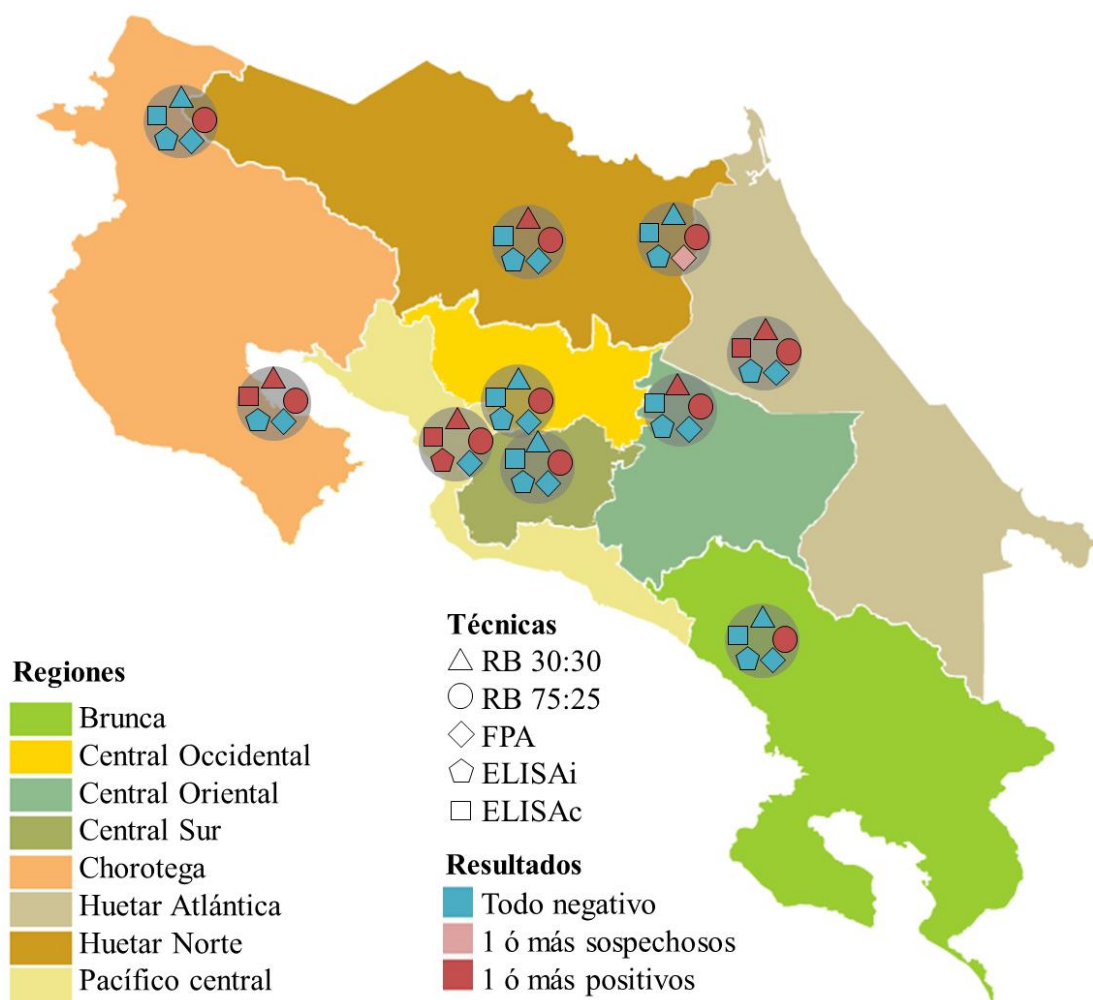


Figura 5. Mapa de distribución de las fincas analizadas y la presencia o no en las mismas de animales seropositivos según las técnicas de diagnóstico utilizadas.

En los resultados combinados de las pruebas serológicas realizadas a las muestras, se observa que ningún suero resultó positivo en los cinco ensayos utilizados, de igual manera tampoco hubo alguno que cumpliera con criterios de positividad en cuatro técnicas de diagnóstico. Conforme disminuye el número de pruebas que resultaron positivas en una misma muestra, mayor es el número de individuos del grupo, tal como lo presenta el Cuadro 10.

Cuadro 10. Combinaciones existentes de resultados de las pruebas serológicas y su respectivo número de individuos de manera exclusiva*.

N° pruebas positivas	N° individuos (%)	Pruebas positivas	N° individuos (%)
3	3 (0.59%)	RB 30:30	2
		RB 75:25	(0.39%)
		ELISAc	
2	10 (1.96%)	RB 75:25	1
		ELISAi	(0.2 %)
		ELISAc	
1	83 (16.27%)	RB 30:30	8
		RB 75:25	(1.57%)
		ELISAc	2 (0.39%)
± (Sospechosa)	1	RB 30:30	1 (0.2%)
		RB 75:25	82 (16.08%)
0	413 (80.66%)	FPA (sospechosa)	1 (0.2%)

*Ningún individuo puede estar en dos categorías, por lo que en los casos que un animal clasifique para más de una categoría, este es asignado a la combinación con mayor número de pruebas.

El Cuadro 11 se basa únicamente en el número de individuos que resultaron positivos en cada combinación, sin importar el número de pruebas positivas, por lo que un individuo puede estar en varias de las posibles combinaciones (por ejemplo un mismo animal puede estar positivo en la combinación RB 30:30 + RB 75:25 + ELISAc y también en la que solo es RB 75:25+ ELISAc).

Cuadro 11. Combinaciones existentes de resultados de las pruebas serológicas y su respectivo número de individuos de manera inclusiva*.

Pruebas positivas	N° individuos (%)
RB 30:30	2
RB 75:25	(0.39%)
ELISAc	
RB 75:25	1
ELISAi	(0.2 %)
ELISAc	
RB 30:30	10
RB 75:25	(1.96%)
RB 75:25	5
ELISAc	(0.98%)
RB 30:30	2
ELISAc	(0.39%)
RB 75:25	1
ELISAi	(0.2%)
ELISAi	1
ELISAc	(0.2%)

*Un mismo individuo puede estar en más de una categoría

Al comparar las técnicas de diagnóstico utilizadas, se tiene que en RB 30:30, de los siete sueros con aglutinación leve, uno resultó negativo en RB 75:25, cinco con reacción moderada y uno con fuerte. Además los cuatro casos que aglutinaron moderadamente en RB 30:30, resultaron positivos en RB 75:25, tres con aglutinación moderada y uno con leve. En FPA y en ELISAi, ninguno de los 11 RB 30:30 positivo resultó de igual manera. En la técnica ELISAc, dos de los animales con aglutinación moderada en RB 30:30 también resultaron positivos. Tal como se muestra en el Cuadro 12.

Cuadro 12. Comparación de resultados de Rosa de Bengala 30:30 contra las otras pruebas serológicas realizadas.

Prueba	Resultados	Rosa Bengala 30:30			
		Negativo	Leve	Moderado	Fuerte
Rosa Bengala 75:25	Negativo	414	1	0	0
	Leve	52	0	0	0
	Moderado	28	5	3	0
	Fuerte	5	1	1	0
FPA	Negativo	115	7	4	0
	Sospechoso	1	0	0	0
	Positivo	0	0	0	0
	Sin analizar	383	0	0	0
ELISAi	Negativo	498	7	4	0
	Sospechoso	0	0	0	0
	Positivo	1	0	0	0
ELISAc	Negativo	496	7	2	0
	Positivo	3	0	2	0

En la técnica RB 75:25, de los 52 individuos reportados con aglutinación leve, todos resultaron negativos en RB 30:30 y en FPA, y solo uno positivo con ELISAi y dos con ELISAc. De los 36 sueros que aglutinaron moderadamente en RB 75:25, solo ocho dieron positivo en RB 30:30 (cinco leves y tres moderados), tres en ELISAc y ninguno en FPA ni ELISAi. Respecto a los siete positivos con aglutinación fuerte en RB 75:25, dos resultaron también positivo en RB 30:30 (uno leve y uno moderado), y negativos en las demás pruebas. Tal como se muestra en el Cuadro 13.

Cuadro 13. Comparación de resultados de Rosa de Bengala 75:25 contra las otras pruebas serológicas realizadas.

Prueba	Resultados	Rosa Bengala 75:25			
		Negativo	Leve	Moderado	Fuerte
Rosa Bengala 30:30	Negativo	414	52	28	5
	Leve	1	0	5	1
	Moderado	0	0	3	1
	Fuerte	0	0	0	0
FPA	Negativo	31	52	36	7
	Sospechoso	1	0	0	0
	Positivo	0	0	0	0
	Sin analizar	383	0	0	0
ELISAi	Negativo	415	51	36	7
	Sospechoso	0	0	0	0
	Positivo	0	1	0	0
ELISAc	Negativo	415	50	33	7
	Positivo	0	2	3	0

En el caso de FPA, prueba con la que se analizaron 127 sueros, solo se encontró un individuo sospechoso (los demás negativos), el cual resultó negativo en las demás técnicas. Tal como se muestra en el Cuadro 14.

Cuadro 14. Comparación de resultados de FPA contra las otras pruebas serológicas realizadas.

Prueba	Resultados	FPA			Sin analizar
		Negativo	Sospechoso	Positivo	
Rosa	Negativo	115	1	0	383
Bengala	Leve	7	0	0	0
30:30	Moderado	4	0	0	0
	Fuerte	0	0	0	0
Rosa	Negativo	31	1	0	383
Bengala	Leve	52	0	0	0
75:25	Moderado	36	0	0	0
	Fuerte	7	0	0	0
ELISAi	Negativo	125	1	0	383
	Sospechoso	0	0	0	0
	Positivo	1	0	0	0
ELISAc	Negativo	121	1	0	383
	Positivo	5	0	0	0

Con la técnica de ELISAi, el único caso que resultó positivo, en RB 75:25 aglutinó levemente y dio positivo en ELISAc, mientras que en RB 30:30 y FPA obtuvo resultados negativos. Tal como se muestra en el Cuadro 15.

Cuadro 15. Comparación de resultados de ELISAi contra las otras pruebas serológicas realizadas.

Prueba	Resultados	ELISAi		
		Negativo	Sospechoso	Positivo
Rosa	Negativo	498	0	1
Bengala	Leve	7	0	0
30:30	Moderado	4	0	0
	Fuerte	0	0	0
Rosa	Negativo	415	0	0
Bengala	Leve	51	0	1
75:25	Moderado	36	0	0
	Fuerte	7	0	0
FPA	Negativo	125	0	1
	Sospechoso	1	0	0
	Positivo	0	0	0
	Sin analizar	383	0	0
ELISAc	Negativo	505	0	0
	Positivo	4	0	1

Respecto al ELISAc, los cinco individuos resultantes positivos dieron como tal en RB 75:25 (dos leves y tres moderados), dos resultaron positivos en RB 30:30 (ambos moderados) y uno en ELISAi. Tal como se muestra en el Cuadro 16

Cuadro 16. Comparación de resultados de ELISAc contra las otras pruebas serológicas realizadas.

Prueba	Resultados	ELISAc	
		Negativo	Positivo
Rosa	Negativo	496	3
Bengala	Leve	7	0
30:30	Moderado	2	2
	Fuerte	0	0
Rosa	Negativo	415	0
Bengala	Leve	50	2
75:25	Moderado	33	3
	Fuerte	7	0
FPA	Negativo	121	5
	Sospechoso	1	0
	Positivo	0	0
	Sin analizar	383	0
ELISAi	Negativo	505	4
	Sospechoso	0	0
	Positivo	0	1

3.6. Encuestas

Los resultados obtenidos de las preguntas de interés respecto al riesgo de los animales de adquirir *Brucella* spp., en las encuestas realizadas a los productores de las diez fincas analizadas se presentan el Cuadro 17.

Cuadro 17. Presencia de factores de riesgo y de protección para la infección por *Brucella* spp. en las fincas analizadas.

	Factores	Fincas con factor
Infra- estructura	Manga	7
	Corral	10
	Cepo	5
	Paridera	8
Manejo	Pastoreo	2
	Semiestabulado	7
	Estabulado	1
	Limita con áreas silvestres	6
	Drena a otra finca	5
	Recibe drenaje de otra finca	4
	Usa heces sin tratar como abono	5
	Presencia de especies portadoras de <i>Brucella</i>	7
Manejo reproductivo	Monta natural	10
	Inseminación artificial	2
	Manejo de ovejas jóvenes con recién paridas	6
	Aislamiento de hembras próximas a parto	9
Reemplazo	Reemplazos externos	3
	Prueba de brucelosis a reemplazos externos previo ingreso	0
	Cuarentena a reemplazos externos	1
Historia clínica	Presencia de abortos último año	5
	Desecho de animal que aborta	1
	Retenciones placentarias último año	0
	Ovejas nacidas débiles el último año	7
	Natimuertos el último año	4
	Eliminación de abortos, placentas, desechos de partos y natimuertos:	
	<i>Entierra</i>	8
	<i>Aplica cal</i>	1
	<i>Consumo animal</i>	1
	<i>Abono</i>	1
	Realización de pruebas diagnósticas de brucelosis	5

3.7. Serología de segundo muestreo

Con respecto a los resultados del segundo sangrado realizado a los animales de la Finca 6 (basado en el número asignado a las fincas en el Cuadro 2), estos permitieron escoger tres animales para necropsia (los primeros tres del Cuadro 18), debido a que esta cantidad de individuos fueron los que obtuvieron en sus resultados positividad en al menos un RB y en ambos ELISA, tal como se había establecido en metodología para la escogencia de los ovinos que serían sacrificados.

Cuadro 18. Resultados de sueros positivos en al menos alguna prueba, de los animales sangrados en el segundo muestreo a la Finca 6.

	RB 30:30	RB 75:25	ELISAI (%S/P)	ELISAc (PI)	FPA (mP)	
1	++	++	149.83	72.25	3.8	Sacrificio
2	++	+	148.40	50.20	2.0	
3	-	+	127.94	48.76	3.5	
4	-	++	108.25	51.81	5.0	
5	-	+	107.26	51.31	3.2	
6	++	++	88.01	59.40	3.8	
7	++	++	80.42	11.35	2.0	
8	+	++	79.87	52.09	2.7	
9	++	++	35.31	12.28	4.0	
10	++	+	33.22	15.11	1.0	
11	+	+	25.85	17.08	3.1	
12	-	++	14.52	25.60	3.7	
13	-	++	11.11	-8.59	1.8	
14	-	+	9.46	3.04	3.9	
15	+	++	8.58	36.48	0.9	
16	-	++	8.25	-1.97	5.0	
17	+	-	6.27	-2.54	5.0	
18	-	+	6.05	13.71	2.2	
19	+	+	4.95	15.32	3.3	
20	-	++	3.52	-4.12	3.4	
21	+	++	2.31	-21.45	4.3	
22	-	++	0.77	-12.50	4.5	

RB: Negativo - Aglutinación leve + Aglutinación moderada ++ Aglutinación fuerte +++
FPA: Negativo < 10 mP Sospechoso 10-20 mP Positivo > 20mP
ELISAI: Negativo ≤ 110%S/P Sospechoso 110-120%S/P Positivo ≥ 120%S/P
ELISAc: Negativo <30 PI Positivo ≥ 30 PI

3.8. Cultivos bacteriológicos

Lo que respecta a los cultivos bacteriológicos realizados a órganos de los animales sacrificados, los tres individuos presentaron cultivos compatibles con *Brucella* spp., evidenciado por pruebas bioquímicas convencionales (urea, nitritos, oxidasa, producción de H₂S) y tinción Gram (Figura 6) tal como lo muestra el Cuadro 19.

Cuadro 19. Resultados de los cultivos bacteriológicos.

Tejido	Oveja 1	Oveja 2	Oveja 3
Hígado	Positivo	NR	Negativo
Bazo	NR	NR	Negativo
Gl. Mamaria	Negativo	Negativo	NR
Lnn. Parotídeos	NR	Positivo	Positivo
Lnn. Submandibulares	Positivo	Negativo	Negativo
Lnn. Retrofaríngeos	Negativo	Negativo	Negativo
Lnn. Laríngeos	Negativo	Negativo	Positivo
Lnn. Preescapulares	Positivo	Negativo	Negativo
Lnn. Mediastínicos	NR	Negativo	Negativo
Lnn. Ilíacos	Negativo	NR	Negativo
Lnn. Mamarios	Positivo	Negativo	Negativo
Absceso mamario	NR	NR	Negativo
Leche	Negativo	Negativo	Negativo
Placentomas	NR	Negativo	Negativo
Flóculos placenta	NR	NR	Negativo
Cont abomaso feto	NR	Negativo	Negativo
Pulmón de feto	NR	Negativo	Negativo
Hígado-bazo de feto	NR	NR	Negativo

NR: No realizado

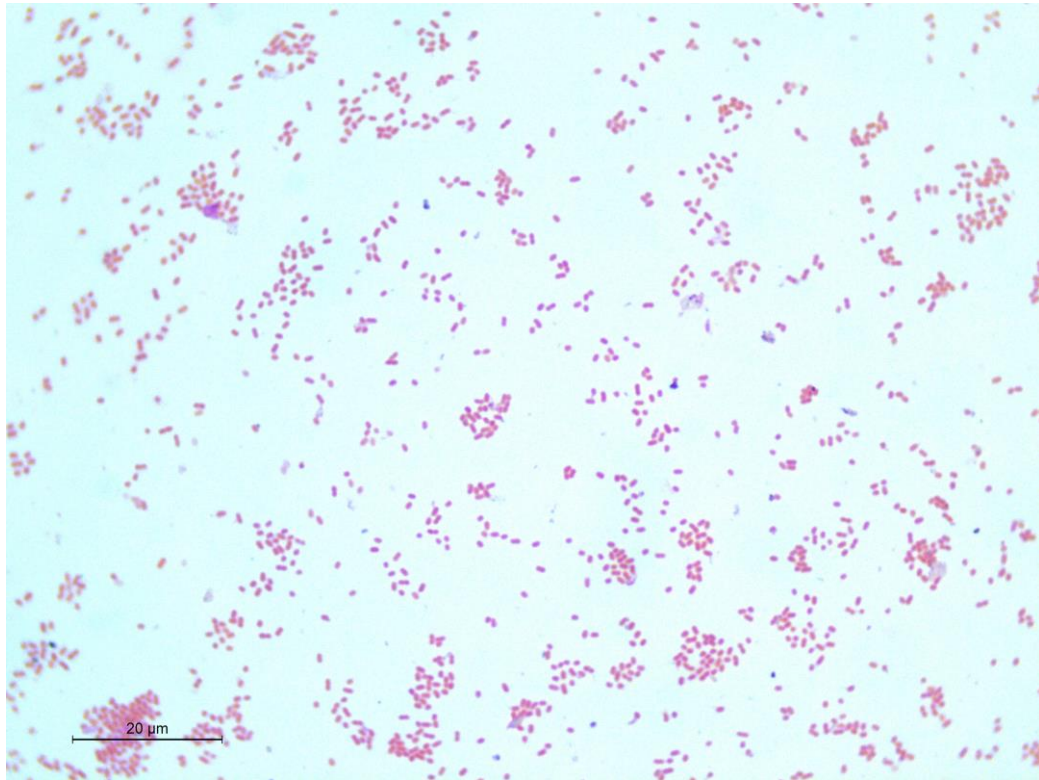


Figura 6. Fotografía de cocobacilos Gram negativos del aislamiento bacteriano obtenido de los linfonodos submandibulares de la oveja 1.

3.9. Inmunofluorescencia directa

Aunque el control positivo mostró una reacción de fluorescencia positiva, en las muestras de los cultivos bacterianos no fue posible observar nada en el microscopio utilizado para este fin (Figura 7).

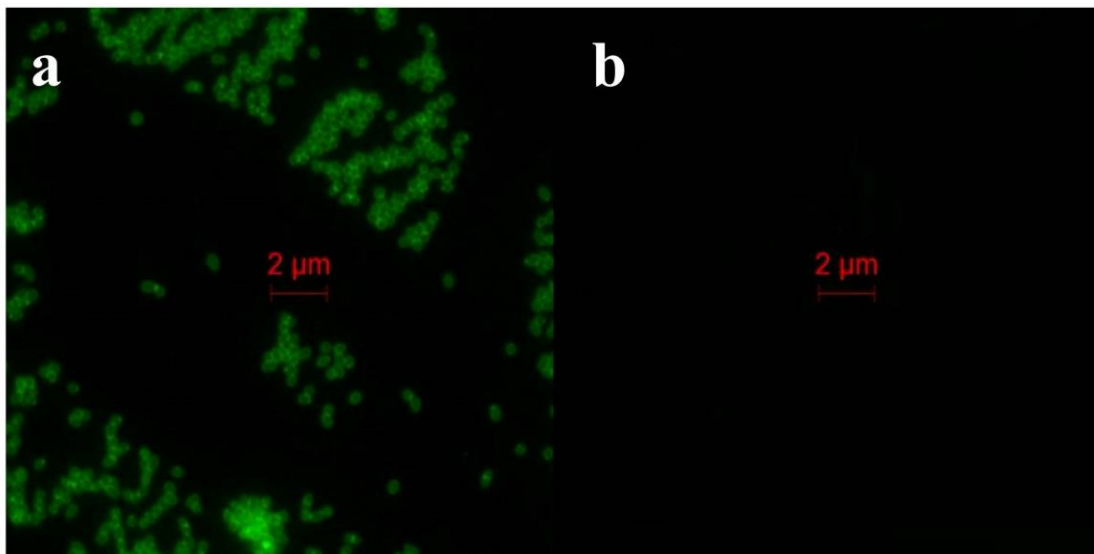


Figura 7. Fotografías de: **a.** Control positivo utilizado en la inmunofluorescencia directa, correspondiente a aislamiento de *Brucella ceti*. **b.** Inmunofluorescencia directa negativa del aislamiento bacteriano obtenido de los linfonodos submandibulares de la oveja 1.

3.10. Inmunohistoquímica

En los cortes utilizados (pertenecían a los tejidos con aislamiento bacteriano) no fue posible localizar presencia del antígeno, en la Figura 8 se puede observar la reacción positiva del tejido control utilizado (placenta de bovino), como la ausencia de cualquier reacción en una de las muestras analizadas.

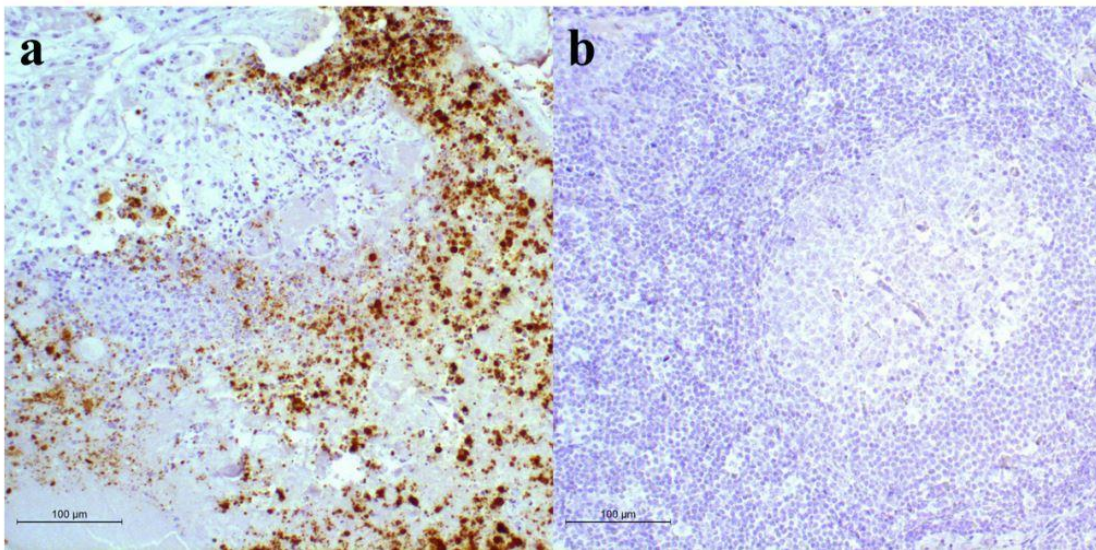


Figura 8. Fotografías de: **a.** Control positivo utilizado en la IHQ, correspondiente a placenta de bovino. **b.** IHQ negativa de linfonodo submandibular de la oveja 1.

3.11. Caracterización molecular

Los aislamientos bacterianos de los linfonodos preescapulares y mamarios de la oveja 1, linfonodos parotídeos de la oveja 2, y linfonodos laríngeos y parotídeos de la oveja 3 dieron positivo para el gen *Bcsp31* de *Brucella*, de acuerdo al PCR en tiempo real. En las Figuras 9 y 10 se aprecia como la fluorescencia del control positivo y de las muestras evidencia la amplificación del mencionado gen alrededor de los ciclos 25 y 35.

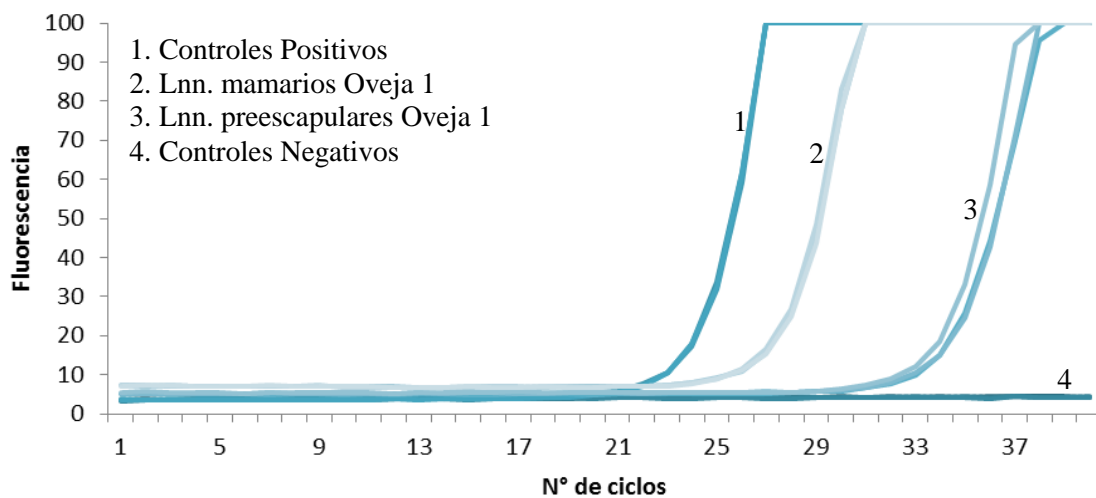


Figura 9. Curvas de amplificación de *Bcsp31* obtenidas de los aislamientos bacterianos de la oveja sacrificada 1. Figura realizada con base en datos aportados por el PIET.

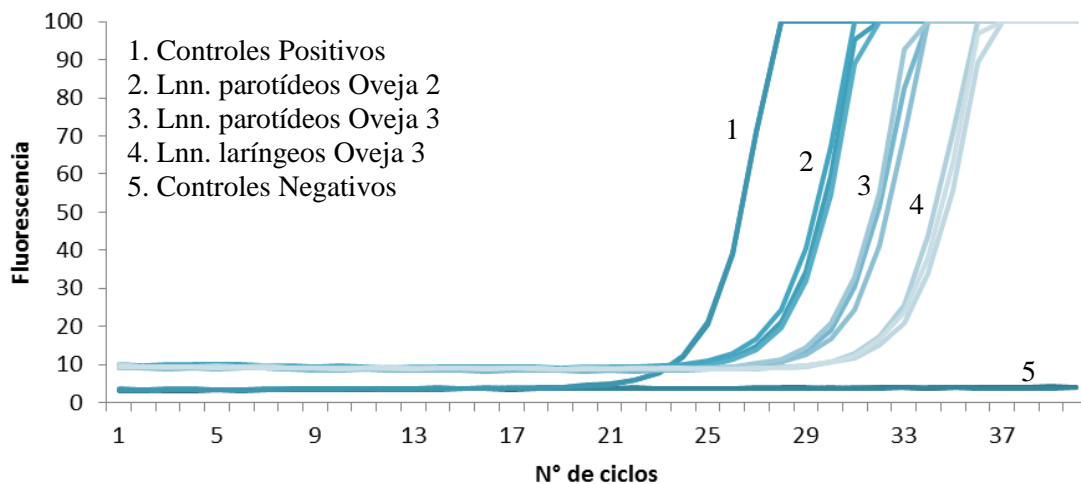


Figura 10. Curvas de amplificación de *Bcsp31* obtenidas de los aislamientos bacterianos de las ovejas sacrificadas 2 y 3. Figura realizada con base en datos aportados por el PIET.

Con la utilización del PCR múltiple Bruce-ladder no se ha logrado identificar ninguna especie de *Brucella*, ya que ningún patrón de bandas obtenido coincide con los controles (Figura 11 y 12).

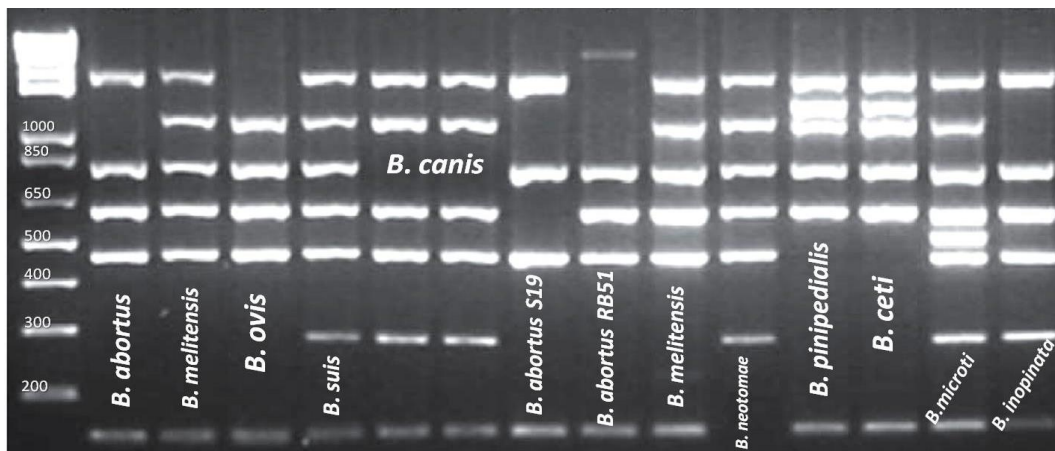


Figura 11. Patrones de bandas para las distintas especies de *Brucella* en el PCR múltiple Bruce-ladder. (Fuente: PIET).

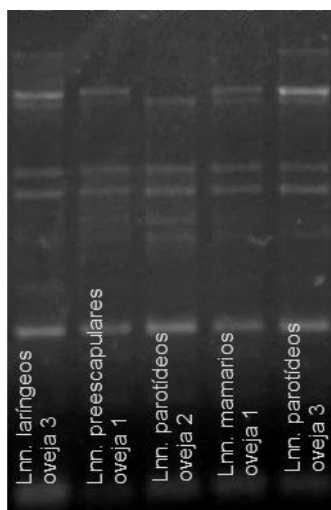


Figura 12. Patrones de bandas obtenidos con el PCR múltiple Bruce-ladder a partir de los aislamientos bacterianos de las ovejas sacrificadas. (Fuente: PIET).

4. DISCUSIÓN

En el diagnóstico de brucelosis existen gran cantidad de técnicas con mayor o menor sensibilidad y especificidad, entre todas, se considera como diagnóstico definitivo al aislamiento de *Brucella*, pero este tiene éxito en solo el 40 - 70 % de los casos. Por lo que el diagnóstico en laboratorio se basa generalmente en otras técnicas, que en su mayoría lo que detectan es la presencia de anticuerpos específicos de suero (Çelik et al., 2012; OIE, 2012).

Respecto a la capacidad de detección de animales reaccionantes mostrada por las dos variantes de RB utilizadas en la presente investigación, se tiene que es superior el RB 75:25 en donde se detectaron 95 de 510 (18.63 %) respecto al RB 30:30 con el que se detectó 11 de 510 (2.16 %). Esa capacidad menor para detectar animales reaccionantes por el RB 30:30 le impidió incluso detectar el único caso positivo por ELISAI del primer muestreo, que sí fue detectado en RB 75:25. Los resultados de la variación recomendada por la OIE del RB (75:25) demuestran que es una mejor herramienta de tamizaje para la detección de presencia de animales potencialmente infectados con *B. abortus* o *B. melitensis*, siendo esta última de mayor riesgo en salud pública (SCAHAW, 2001; Godfroid et al., 2005; OIE, 2012).

Los 95 sueros reaccionantes en RB 75:25 se disminuyeron a cinco con el ELISAc (0.98 %) y a uno con el ELISAI (0.2 %). Por lo que los resultados de los ELISAs evidenciaron que el ELISAc detectó más animales reaccionantes que el ELISAI utilizado. Las muestras positivas en ELISAI siempre resultaron como tal en el ELISAc, pero no a la inversa, debido a que esta segunda técnica resultó con valores superiores al corte para una cantidad mayor de

individuos. Durante el estudio no se sacrificó a animales que únicamente se diagnosticaran positivos mediante el ELISAc para cultivos bacterianos, PCR e IHQ, por lo que no se puede afirmar que estos casos realmente fueran positivos y por ende que esta prueba haya sido más sensible o menos específica respecto al ELISAi, aunque la literatura sí reporta que el ELISAc posee mayor sensibilidad y menor especificidad (Gall y Nielsen, 2004).

Se debe tomar en cuenta que en estas pruebas, el conjugado en el ELISAc es específico contra el anticuerpo monoclonal de ratón, mientras que en el ELISAi de IDVet[®] es multiespecie contra los anticuerpos anti-LPS de *Brucella* de bovinos, caprinos, ovinos y porcinos (SENASA, 2009). Por lo que sería de utilidad realizar un estudio en el que los kits sean específicos para pequeños rumiantes o incluso para ovinos, donde el conjugado sea específico contra anticuerpos anti-LPS de *Brucella* de ovinos, y comparar tanto sensibilidad y especificidad respecto al ELISAi multiespecie y al ELISAc, debido a que es posible que con un conjugado específico el ELISAi mejore considerablemente su capacidad de detección.

En el estudio, el FPA mostró tener un valor kappa de 0.7 con respecto a los sueros control de ovinos utilizados en este estudio, ya que de los 20 sueros control positivos solo 14 fue capaz de diagnosticar como tal, mientras que todos los sueros negativos resultaron con los valores esperados. Estos resultados coinciden con un estudio de Matope y colaboradores (2011), donde el FPA obtiene el valor de sensibilidad de 71.3 %.

De las 127 muestras analizadas en FPA dentro de este estudio (96 positivas en alguna otra técnica y 31 negativas escogidas al azar), ninguna muestra obtuvo un valor que le

permitiera estar por encima del corte, únicamente un animal resultó como sospechoso, pero este no fue positivo ni sospechoso en ninguna otra técnica. Por lo tanto, de utilizarse esta prueba como técnica complementaria de los otros ensayos, su interpretación debe realizarse con cautela.

Se debe tomar en cuenta que entre los resultados obtenidos como seropositivos de las fincas muestreadas, algunos de ellos pueden ser falsos positivos, ya que existe la posibilidad de que se den reacciones cruzadas serológicas por infecciones con agentes tales como *Escherichia coli* 0:116 y 0:157, serotipos de *Salmonella* del grupo N de Kauffmann-White, *Pseudomonas maltophilia*, *Yersinia enterocolitica* 0:9 y 0:16. Todos estos microorganismos podrían generar reacciones cruzadas, debido a los componentes de membrana externa que poseen y que son similares a los presentes en las especies del género *Brucella*; sin embargo, en Costa Rica se desconoce la prevalencia o existencia de algunos de estos como agentes causales de enfermedad en animales o humanos (Corbel, 1975; Corbel et al., 1984).

Existe la posibilidad de que algunos casos hayan sido falsos negativos en las pruebas serológicas, entre las razones están, el período que transcurre desde la exposición a la infección hasta la aparición de anticuerpos, animales infectados que no alcanzan un título significativo, infecciones crónicas, porque los anticuerpos podrían haber descendido a niveles no diagnosticables (Castro et al., 2005). En la literatura se reporta que las ovejas son hospederos no tan eficientes para cepas de *B. abortus*, llegando a ser las infecciones autolimitantes, a diferencia de la infección en estos animales con otras especies de bacterias como *B. melitensis* o *B. ovis* (Moreno y Moriyón, 2006).

De acuerdo a los resultados obtenidos con todas las técnicas serológicas de diagnóstico utilizadas, se evidencia que la seroprevalencia de anticuerpos contra antígenos de *Brucella* spp. en el hato ovino costarricense está en un rango de 0.2 % a 0.98 %, valores obtenidos por la cantidad de animales que resultaron positivos en al menos dos pruebas con las diferentes combinaciones que obtuvieron individuos positivos (no se toma en cuenta la combinación RB 30:30 y RB 75:25 porque ambas técnicas utilizan el mismo método para la detección de posibles animales infectados), de tal manera que se rechaza la hipótesis nula planteada de que en el país existen animales seropositivos contra antígenos de *Brucella* spp. en una prevalencia mayor a 1 %.

Respecto a los resultados de las encuestas aplicadas, estos distan de lo observado durante las visitas a las fincas, además, por no tener casos confirmados como positivos en ningún hato, no es posible establecer una correlación entre la presencia de la bacteria con los factores de riesgo presentes en las producciones. Pero, a pesar de ello, se debe hacer hincapié en el correcto manejo sanitario que deben tener las fincas (Reviriego et al., 2000; Al-Majali et al., 2009).

Aunque en primera instancia, tanto los aislamientos bacterianos como el PCR del gen *Bcsp31*, parecieran compatibles con *Brucella* spp., los resultados del análisis molecular con el PCR múltiple Bruce-ladder demostró de manera concluyente que los aislamientos corresponden a un género diferente (López et al, 2011; Sidor et al., 2013), el cual comparte algunas características con miembros del género *Brucella*, como la presencia de un marco de lectura compatible con el gen *Bcsp31*, que está presente en varias alfa-proteobacterias, tal y

como se puede determinar en un “blast” de los genomas de varios miembros de este grupo de bacterias. Además, estos aislamientos resultaron igualmente negativos al realizarle la prueba de inmunofluorescencia directa, corroborándose la ausencia de reacción de anticuerpos desarrollados específicamente para reconocer miembros del género *Brucella*. Esto se confirma también por la IHQ, porque a pesar de la buena sensibilidad de la técnica utilizada, fue evidente la falta de reconocimiento en tejidos usando anticuerpos específicos (Pardo et al., 1998).

Si bien no se logró identificar el género *Brucella*, ni ninguna de sus especies, de los aislamientos obtenidos en este estudio, sería de esperar que en caso de que algunos de los individuos con serología positiva realmente estuvieran infectados, y no fueran reacciones cruzadas, se debieran a infecciones transitorias por *B. abortus*, ya que esta especie sí ha sido identificada en el país. La infección cruzada de bovinos (hospederos de *B. abortus*) a ovinos puede deberse a la movilización de ovinos de un hato a otro, sin control alguno (lo que facilita la diseminación de cualquier enfermedad). Además, según registros en Costa Rica, desde 1983 hasta el día de hoy, en los pacientes humanos de los cuales se ha logrado aislar *Brucella*, estos corresponden a *B. abortus*, y no a *B. melitensis*, a pesar de ser este último el principal agente zoonótico del género (Moreno, 2002; Godfroid et al., 2005; Montero et al., 2006; Tique et al., 2010; OIE, 2012; D. Montero, comunicación personal, 02 de Abril 2014; G. Chanto, comunicación personal, 08 de Abril 2014).

Con este estudio se ha demostrado, que la seroprevalencia contra antígenos de *Brucella* spp. en los hatos ovinos de Costa Rica es baja (0.2 a 0.98 %), asimismo sigue sin confirmarse

ningún caso de *B. ovis* ni *B. melitensis*, lo cual obliga al país y a sus productores a ser muy cautelosos y a tomar medidas estrictas y oportunas para evitar que se eleve el número de casos de brucelosis, y también, evitar a toda costa el ingreso de las especies del género *Brucella* que aún no se han encontrado presentes a nivel nacional. Esta condición de la brucelosis ovina en el país resulta comercialmente favorable, ya que otros estudios han determinado que en América Latina de 1968 a 2006, *B. melitensis* fue la especie aislada con mayor frecuencia en humanos y cabras, mientras que en ovejas la más frecuente fue *B. ovis*, seguida de *B. suis* y *B. melitensis*. (Lucero et al., 2008).

Se deben implementar medidas para mantener la condición sanitaria respecto a esta enfermedad en Costa Rica, por lo tanto, se debe evitar la importación o tránsito de animales provenientes de países con conocidos problemas de *B. melitensis* y otras brucelas en caprinos, ovinos y humanos, tales como México y Guatemala (Núñez et al., 1997; Moreno, 2002), que son socios comerciales para Costa Rica y países vecinos. De aquellos países que se considere tienen condiciones epidemiológicas similares a las de Costa Rica o con prevalencias menores, se podría admitir animales provenientes de hatos libres y con pruebas serológicas, tales como RB con la modificación recomendada por la OIE para ovinos en conjunto con ELISAi y ELISAc.

5. CONCLUSIONES

1. Esta investigación representa un recurso de información de las poblaciones y manejo de los ovinos en Costa Rica y para las medidas sanitarias respecto a la brucelosis en ovinos que se deberán establecer en el país.
2. Se determinó la presencia de anticuerpos contra antígenos de brucelas lisas en sueros de ovinos de Costa Rica mediante Rosa de Bengala, ELISA indirecto y ELISA competitivo. Dicha seropositividad presentó una prevalencia de 0.2 % a 0.98 %.
3. No se encontraron carneros con sintomatología compatible con la infección por *Brucella ovis*.
4. De los animales seropositivos en Rosa de Bengala, ELISAI y ELISAc se obtuvo aislamiento bacteriano compatible morfológica y bioquímicamente con el género *Brucella*. Sin embargo, la caracterización molecular y la inmunohistoquímica indicaron que el aislamiento no pertenece a este género.
5. El banco de sueros creado podrá ser utilizado en estudios posteriores.

6. RECOMENDACIONES

1. Mejorar el manejo de las fincas, ya que en las condiciones actuales existe escasas medidas de bioseguridad, ausencia de registros y de identificación, esto facilita la diseminación de *Brucella* o cualquier agente infeccioso.
2. Las explotaciones de ovinos en el país deben realizar exámenes para el diagnóstico de brucelosis con cierta periodicidad, y de manera obligatoria a cualquier animal que ingrese desde otra finca, así como instaurar las cuarentenas respectivas.
3. Utilizar para el diagnóstico de brucelosis el RB de acuerdo a las recomendaciones de la OIE (75:25), complementado con ELISAc (Svanovir[®]), ya que ambas pruebas demostraron ser más sensibles para detectar animales reaccionantes que el Rosa Bengala tradicional (30:30) y el ELISAi (IDVet[®]).
4. Implementar el uso de un ELISAi específico para ovinos, y estudiar sus diferencias en los resultados con respecto a ELISAi con conjugado multiespecie y con ELISAc.
5. Incentivar a los finqueros a obtener certificaciones de hatos libres de brucelosis, y educar a población general sobre los peligros que implica consumir productos derivados de animales infectados, lo cual ayudaría a crear en el comercio un incentivo para esas fincas libres de la enfermedad.

6. Los animales muertos o los desechos de partos o abortos de las fincas deben ser enterrados o descartados de manera adecuada, así se evita su consumo o contacto por parte de otros animales.
7. Se debe evitar la importación de animales vivos y semen desde países con presencia de *B. melitensis* o *B. ovis*. Además el SENASA como ente regulador debe reforzar los controles y las políticas en contra de la comercialización ilegal de estos animales.
8. SENASA debe instaurar lo antes posible las regulaciones para la importación de ovinos en el país. De aquellos países que se decidiera aceptar animales vivos y semen, estos deben provenir de hatos certificados como libres de la enfermedad, de ovinos como de otras especies presentes en la finca (por ejemplo caprinos, bovinos y bubalinos), y debe certificarse que las pruebas utilizadas para el diagnóstico de estos animales sean Rosa de Bengala con la modificación recomendada por la OIE, ELISAI y ELISAc.
9. Mantener una vigilancia activa constante, con el fin de atender a tiempo cualquier posible foco de infección, el cual implicaría un riesgo para el resto de hatos nacionales.
10. Realizar un estudio a nivel nacional sobre otros agentes que también causen enfermedades abortivas, por ejemplo *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum*. Esto porque a pesar de la baja prevalencia de brucelosis, los abortos son un problema reportado con frecuencia en los ovinos.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Majali, A.M., A.P. Talafha, M.M. Ababneh & M.M Ababneh. 2009. Seroprevalence and risk factors for bovine brucellosis in Jordan. *J. Vet. Sci.* 10: 61-65.
- Alton, G.G., L.M. Jones, R.D. Angus & J.M. Verger. 1988. Techniques for brucellosis laboratory. INRA, France.
- Blasco, J.M. 2004. Estado actual de la brucelosis en España. *Prof. Vet.* 58: 22-34.
- Cannon, R.M. & R.T. Roe. 1982. Livestock disease surveys: a field manual for veterinarians. Australian Government, Aust.
- Carter G.R. & D.J. Wise. 2004. Essentials of veterinary bacteriology and micology. 6. ed. Iowa State Press, Iowa, US.
- Castro, H.A., S.R. González & M.I. Prat. 2005. Brucellosis: una revisión práctica. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* 39: 203-216.
- Çelik, A., Z. Yulugkural, C. Kilincer, M. Hamamcioglu, F. Kuloglu & F. Akata. 2012. Negative serology: could exclude the diagnosis of brucellisis?. *Rheumatol. Int.* 32: 2547-2549.
- Corbel, M.J. 1975. The serological relationship between *Brucella* spp., *Yersinia enterocolitica* serotype IX and *Salmonella* serotypes of Kauffmann-White group N. *J. Hyg-Cambridge.* 75: 151-171.

- Corbel, M.J., F.A. Stuart & R.A. Brewer. 1984. Observations on serological cross-reactions between smooth *Brucella* species and organisms of other genera. *Dev. Biol. Stand.* 56: 341-348.
- Crespo, F. 1994. *Brucelosis ovina y caprina*. Office International des Epizooties, París, Francia.
- De, B., L. Stauffer, M. Koylass, S. Harp, J. Gee, L. Helsel, A. Steingerwalt, R. Vega, T. Clark, M. Daneshvar, P. Wilkins & A. Whatmore. 2008. Novel *Brucella* strain (BO1) associated with a prosthetic breast implant infection. *J. Clin. Microbiol.* 46: 43-49
- Devendra, C. 2011. Invited review - Integrated tree crops-ruminants systems in South East Asia: advances in productivity enhancement and environmental sustainability. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 24: 587-601.
- Edmonds, M.D., A. Cloeckaert, N.J. Booth, W.T. Fulton, S.D. Hagius, J.V. Walker & P.H. Elzer. 2001. Attenuation of a *Brucella abortus* mutant lacking a major 25 kDa outer membrane protein in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 62: 1461-1466.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura), OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) & WHO (Organización Mundial de la Salud). 2006. *Brucellosis in humans and animals*. WHO, Geneva, Switzerland.

- Ficapal, C.A. 1993. Brucelosis ovina por *Brucella ovis*: evaluación de pruebas diagnósticas y análisis de la incidencia en Cataluña. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, Esp.
- Foster, G., B.S. Osterdam, J. Godfroid, I. Jacques & A. Cloeckart. 2007. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seal as their preferred hosts. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57: 2688-2693.
- Gall, D. & K. Nielsen. 2004. Serological diagnosis of bovine brucellosis: a review of test performance and cost comparison. Rev. Sci. Off. Int. Epiz. 23: 989-1002.
- Godfroid, J., A. Cloeckart, J.P. Liautard, S. Kohler, D. Fretin, K. Walravens, B. Garin & J.J. Letesson. 2005. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. Vet. Res. 36: 313-326.
- Hernández, G. 2006. Desarrollo y validación química y serológica de un ensayo inmunoenzimático ELISA para el diagnóstico de brucelosis en odontocetos. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional, Heredia, CR
- Hernández, G., C.A. Manire, R. González, E. Barquero, C. Guzmán, L. Staggs, R. Thompson, E. Chaves & E. Moreno. 2009. Serological diagnosis of *Brucella* infections in odontocetes. Clin. Vaccine Immunol. 16: 906-915.

- Jiménez, C. 2013. Validación de un protocolo para la caracterización molecular de aislamientos de bacterias del género *Brucella* mediante un ensayo múltiple basado en la detección de polimorfismos en un solo nucleótido. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional, Heredia, CR.
- Ling, W. & K. Nielsen. 2010. Review of detection of *Brucella* spp. by polymerase chain reaction. *Croat. Med. J.* 51: 306-313.
- López, I., D. García, C.M. Marín, M.J. de Miguel, E. Barquero, C. Guzmán, D. Albert & B. Garín. 2011. New Bruce-ladder multiplex PCR assay for the biovar typing of *Brucella suis* and the discrimination of *Brucella suis* and *Brucella canis*. *Vet. Microbiol.* 154: 152-155.
- Lucero, N.E., S.M. Ayala, G.I. Escobar & N.R. Jacob. 2008. *Brucella* isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. *Epidemiol. Infect.* 136: 496-503.
- Marín, C.M., M.P. Jiménez, J.M. Blasco, C. Gamazo, I. Moriyón & R. Díaz. 1989. Comparison of three serological tests for *Brucella ovis* infection of rams using different antigenic extracts. *Vet. Rec.* 125: 504-508.
- Marín, C.M., E. Moreno, I. Moriyón, R. Díaz & J.M. Blasco. 1999. Performance of competitive and indirect enzyme-linked immunosorbent assays, gel immunoprecipitation with native hapten polysaccharide, and standard serological tests in diagnosis of sheep brucellosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6: 269-272.

- Matope, G., J.B. Muma, N. Toft, E. Gori, A. Lund, K. Nielsen & E. Skjerve. 2011. Evaluation of sensitivity and specificity of RBT, c-ELISA and fluorescence polarisation assay for diagnosis of brucellosis in cattle using latent class analysis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 141: 58-63.
- Méndez, G., E. Díaz, J.F. Morales, F. Aguilar & F. Suárez. 1999. Epididimitis ovina: estudios bacteriológico y serológico. *Vet. Méx.* 30: 329-336.
- Montero, D., I. Camacho & M. Campos. 2006. Comercialización de rumiantes menores en Costa Rica. Instituto Nacional de Aprendizaje, San José, CR.
- Moreno, E. 2002. Brucellosis in Central America. *Vet. Microbiol.* 90: 31-38.
- Moreno, E. 2004. Desarrollo y validación de un ensayo inmunoenzimático (ELISA) para el diagnóstico de la brucelosis. Manual, CONICIT (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas), Costa Rica.
- Moreno, E. & I. Moriyón. 2002. *Brucella melitensis*: a nasty bug with hidden credentials for virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 1-3.
- Moreno, E. & I. Moriyón. 2006. The genus *Brucella*. p.315-456. In M. Dorkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer, and E. Stackebrandt (ed), *The prokaryotes*. Vol. 5. Springer-Verlag, New York, US.
- Moriyón, I. & C. Gamazo. 1990. Estructura antigénica de *Brucella melitensis* y *Brucella ovis*. *Ovis.* 8: 35-49.

- Nasruddin, N.S., M. Mazlan, M.Z. Saad, H.Hamzah & J. Sabri. 2014. Histopathology and immunochemistry assessments of acute experimental infection by *Brucella melitensis* in bucks. *Open Journal of Pathology*. 4: 54-63
- Noyma, M., É. Azevedo, T. Alvez & R. Lima. 2009. The genus *Brucella* and clinical manifestations of brucellosis. *Cienc. Rural*. 39: 2252-2260.
- Núñez, E.D., E. Díaz, F. Velázquez, F. Trigo & F. Suárez. 1997. Presencia de anticuerpos contra diferentes especies de *Brucella* en sementales ovinos jóvenes. *Vet. Méx.* 28: 241-245.
- OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal). 2012. Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres. 7. ed. OIE, París, Francia.
- Pardo, J., A. Panizo & L. Martínez. 1998. Valoración del sistema de polímeros de dextrano *Envision* (PDE) en la detección inmunohistoquímica. *Rev. Esp. Patol.* 31: 9-16.
- Pugh, D.G. 2002. *Sheep and Goat Medicine*. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, US.
- Rahaley, R.S., S.M. Dennis & M.S. Smeltzer. 1983. Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay and complement fixation test for detecting *Brucella ovis* antibodies in sheep. *Vet. Rec.* 113: 409-412.
- Reviriego, F.J., M.A. Moreno & L. Domínguez. 2000. Risk factors brucellosis seroprevalence of sheep and goat flocks in Spain. *Prev. Vet. Med.* 44: 167-173.

- Ris, D.R., K.L. Hamel & D.L. Long. 1984. Comparison of an enzyme-linked immunospecific assay (ELISA) with the cold complement fixation test for the serodiagnosis of *Brucella ovis* infection. *New Zeal. Vet. J.* 32: 18-20.
- Rivers, R., E. Andrews, A. González, G. Donoso, A. Oñate. 2006. *Brucella abortus*: inmunidad, vacunas y estrategias de prevención basadas en ácidos nucleicos. *Arch. Med. Vet.* 38: 7-18.
- Robles, C.A. 1998. Epididimitis contagiosa de los carneros por *Brucella ovis*. *Méd Vet.* 1: 1-9.
- Robles, C.A. 2008. Brucelosis en carneros por *Brucella ovis*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Bariloche, Arg.
- SCAHAW (Scientific Committee for Animal Health And Welfare). 2001. Brucellosis in Sheeps and Goats (*Brucella melitensis*). European Commission, Brussels, Belgium.
- Scholz, H., Z. Hubalek, J. Nesvadbova, H. Tomaso, G. Vergnaud, G. Le Fléche, A. Whatmore, S. Dahouk, M. Kruger, C. Lodri & M. Pfeffer. 2008. Isolation of *Brucella microti* from soil. *Emerg. Infect. Dis.* 14: 1316-1317.
- Scott, P.R. 2006. Sheep Medicine. Manson Publishing, London, UK.
- SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). 2009. Manual de diagnóstico serológico de la brucelosis bovina. SENASA, Buenos Aires, Arg.
- Sidor, I.F., J.L. Dunn, G.J. Tsongalis, J. Carlson & S. Frasca. 2013. A multiplex real-time polymerase chain reaction assay with two internal controls for the detection of *Brucella*

- species in tissues, blood, and feces from marine mammals. *J. Vet. Diagn. Invest.* 25: 72-81.
- Sohn, A.H., W. S. Probert, C. A. Glaser, N. Gupta, A. W. Bollen, J. D. Wong, E. M. Grace, & W. C. McDonald. 2003. Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp. *Emerg. Infect. Dis.* 9: 485–488.
- Songer, J.G. & K.W. Post. 2005. *Veterinary microbiology: bacterial and fungal agents of animal disease.* Elsevier Saunders, St Louis, Missouri, US.
- Tique, V., E. Daza, J. Álvarez & S. Mattar. 2010. Seroprevalencia de *Brucella abortus* y ocurrencia de *Brucella melitensis* en caprinos y en ovinos de Cesar y Sucre. *Rev. UDCA. Actual. Divulg. Cient.*13: 133-139.
- Tortora, G.J., B.R. Funke & Ch. L. Case. 2007. *Introducción a la microbiología.* 9. ed. Médica Panamericana, Madrid, Esp.

8. ANEXOS

8.1. Anexo 1. Encuesta telefónica de brucelosis ovina en Costa Rica

Nombre de la finca

Propietario:

Teléfono:

Región:

Provincia:

Cantón:

Distrito:

Caserío:

Dirección exacta:

Fecha realización:

1. Características de la finca:
 - 1.1 ¿La finca limita con áreas de vida silvestre?
 - 1.2 ¿La finca drena a otra finca?
 - 1.3 ¿Usa heces de las ovejas sin tratar como abono?
 - 1.4 ¿Cuál es el propósito de la finca?

2. Población animal:
 - 2.1 Número total de ovejas:
 - 2.2 Número de Hembras:
 - 2.3 Número de Machos:
 - 2.4 ¿De qué edad a qué edad maneja el hato?

3. Manejo sanitario y reproductivo:
 - 3.1 ¿Utiliza los servicios veterinarios?
 - 3.2 ¿Utiliza para el servicio a hembras: monta natural o inseminación artificial

4. Trazabilidad de ovejas:
 - 4.1 ¿Todas las ovejas son nacidas en su finca o han sido procedentes de otro lugar?

5. Plan de vacunación:
 - 5.1 ¿Vacuna contra Brucelosis?

6. Historia clínica de la finca:
 - 6.1 ¿Ha tenido abortos en su hato el último año?
 - 6.2 ¿Hubo retenciones placentarias?
 - 6.3 ¿Se han presentado natimuertos en este último año?
 - 6.4 ¿Se han reportado nacidos débiles?
 - 6.5 ¿Se han observado problemas de orquitis (inflamación testículos)?
 - 6.6 ¿Cómo elimina los abortos, membranas fetales, desechos de partos y natimuertos?

7. Interacción de los animales:
 - 7.1 ¿Las ovejas se encuentran en contacto con animales de otras especies?

Encuestador:

Observaciones:

8.2. Anexo 2. Encuesta brucelosis ovina en Costa Rica

1. Características de la finca.						
Superficie en hectáreas	Ha.	Infraestructura	Sí	No	Manejo	Marcar con X
1.1 Área total de finca		1.5 Manga			1.9 Pastoreo	
1.2 Área potreros		1.6 Corral			1.10 Semiestabulado	
1.3 Área pasto corte		1.7 Cepo			1.11 Estabulado	
1.4 Otras áreas		1.8 Paridera				
1.12 La finca limita con áreas de vida silvestre		Sí No			1.13 Limita con hatos brucelosos	Sí No N/S
1.14 La finca drena a otra finca		Sí No			1.15 Recibe drenaje de otra finca	Sí No
1.16 Usa heces sin tratar como abono		Sí No				

2. Población animal						
Población ovina	N°	Otras especies domésticas	N°	Otras especies de mamíferos silvestres	Marcar con X	
2.1 Cría hembra		2.9 Equinos		2.16 Coyotes	Sí	No N/S
2.2 Cría macho		2.10 Cerdos		2.17 Zorros	Sí	No N/S
2.3 Corderas jóvenes		2.11 Búfalos		2.18 Pizotes	Sí	No N/S
2.4 Corderos jóvenes		2.12 Bovinos		2.19 Mapaches	Sí	No N/S
2.5 Ovejas en producción		2.13 Caprinos		2.20 Pecaríes	Sí	No N/S
2.6 Carnero		2.14 Perros		2.21 Venados	Sí	No N/S
2.7 Corderos engorde		2.15 Gatos		2.22 Otros:	Sí	No N/S
2.8 Total		2.16 Aves de corral				

3. Manejo sanitario y reproductivo.			
3.1 Utiliza servicios veterinarios en:	Salud	Reproducción	Ninguna
3.2 Utiliza para el servicio a hembras:	Monta natural	Inseminación artificial	Ambas
3.3 Maneja las ovejas jóvenes con ovejas recién paridas:	Sí	No	
3.4 Aísla las hembras próximas al parto:	Sí	No	
3.5 Hay problemas nutricionales y/o parasitarios que afecten la inmunidad.	Sí	No	

4. Reemplazo de ovejas.

4.1 N° ovejas reemplazadas por año: _____ 4.2 Porcentaje anual de ovejas reemplazadas: _____
 4.3 Origen de reemplazos: Propios _____ Externos _____ Ambos _____
 4.4 Compra los reemplazos en: Subasta comercial _____ Subasta en finca de hatos puros _____
 Finca de hatos puros _____ Feria y/o exposición _____ Finca cría comercial _____ Comerciante _____

Otro: _____

4.5 Realiza prueba de brucelosis a los reemplazos previo ingreso al hato: Si _____ No _____

4.6 Realiza cuarentena a reemplazos externos: Si _____ No _____ 4.7 Cuántos días: _____

4.8 ¿Adónde vende los animales con problemas?

Animales	Subasta	Otro ganadero	Matadero	Comerciante	Otro:
Hembras (Si/No)					
Machos (Si/No)					

5. Plan de vacunación.

5.1 Cuáles vacunas aplica.

Vacuna	Anticlostridial	Antitetánica		Otra:
(Si/No)				
Frecuencia				

6. Historia clínica del hato.

6.1 Ha tenido abortos en su hato el último año: Si _____ No _____ 6.2 N° abortos: _____ 6.3 Porcentaje: _____

6.4 Edad aproximada Gestación temprana _____ Gestación media _____ Gestación tardía _____

6.5 Qué hace con la oveja que aborta? _____

6.6 Hubo retenciones de placenta último año? Sí _____ No _____ 6.7 N° casos: _____ 6.8 Porcentaje: _____

6.9 Cómo extrae las placentas retenidas: Manualmente _____ Da tratamiento _____ Aplica peso _____

Otro: _____

6.10 Quién extrae las placentas retenidas: Propietario _____ Peón _____ Mandador _____ Vecino Veterinario _____

Otro: _____

6.11 Han nacido ovejas débiles el último año: Sí _____ No _____ 6.12 N°: _____ 6.13 Porcentaje: _____

6.14 Ha tenido natimuertos el último año: Sí _____ No _____ 6.15 N°: _____ 6.16 Porcentaje: _____

6.17 Cómo elimina los abortos, membranas fetales, placentas, desechos de partos y natimuertos: Entierra _____ Deposita en letrina _____ Aplica cal _____ Aplica desinfectante _____ Otro: _____

6.18 Ha observado orquitis en sus carneros el último año: Sí _____ No _____ 6.19 N° casos _____

6.20 Ha realizado pruebas diagnósticas de brucelosis: Si _____ No _____ 6.21 Cuánto hace _____

6.22 Separa los animales infectados con brucelosis: Si _____ No _____

6.23 Como elimina los animales brucelosos: _____

Subasta _____ Matadero _____ Comerciante _____ Otro: _____

Encuestador		Teléfono oficina		Teléfono celular	
-------------	--	------------------	--	------------------	--

Observaciones: _____

