



UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA ANIMAL

DIPUTACION GENERAL DE ARAGON
SERVICIO DE INVESTIGACION AGRARIA
DEPARTAMENTO DE PRODUCCION ANIMAL

ESTUDIO COMPARATIVO DE DISTINTAS PRUEBAS DIAGNOSTICAS
Y ENSAYOS DE TRATAMIENTO Y PROFILAXIS EN BRUCELOSIS.

Trabajo presentado por la licenciada Dña.
Clara María Marín Alcalá para optar al
grado de Doctora en Veterinaria.

D. ANDRES AVELINO RODRIGUEZ MOURE, CATEDRATICO NUMERARIO DE MICROBIOLOGIA E INMUNOLOGIA Y MIEMBRO DEL DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA ANIMAL DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA, COMO DIRECTOR, Y D. JOSE MARIA BLASCO MARTINEZ, MIEMBRO DEL DEPARTAMENTO DE PRODUCCION ANIMAL DEL SERVICIO DE INVESTIGACION AGRARIA DE LA DIPUTACION GENERAL DE ARAGON, COMO CODIRECTOR

CERTIFICAN:

Que Dña. Clara María Marín Alcalá, licenciada en Veterinaria ha realizado los trabajos de investigación correspondientes a su Tesis Doctoral "Estudio comparativo de distintas pruebas diagnósticas y ensayos de tratamiento y profilaxis en brucelosis" bajo nuestra dirección en los respectivos Departamentos.

Zaragoza, 26 de Mayo de 1988

Fdo.: A.A. Rodriguez Moure

Fdo.: J.M. Blasco Martinez

A mis padres
A José Miguel





ESTE TRABAJO HA SIDO FINANCIADO POR LA COMISION
ASESORA DE INVESTIGACION CIENTIFICA Y TECNICA
(PROYECTO 2910/83) Y POR LA DIPUTACION GENERAL
DE ARAGON (CONVOCATORIAS 1984 Y 1985).

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que directa o indirectamente han colaborado en la realización de este trabajo.

Mi reconocimiento y gratitud al Dr. Andrés Avelino Rodríguez Moure, Catedrático de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, tanto por sus valores humanos como científicos.

Al Dr. José María Blasco Martínez, miembro del Departamento de Producción Animal del Servicio de Investigación Agraria de la Diputación General de Aragón, por su paciencia demostrada en el transcurso de estos cinco últimos años, por su orientación científica, estímulo, e inestimable ayuda en la elaboración y discusión del presente trabajo.

A mi compañera Dña. María Pilar Jiménez de Bagüés Picazo, Becaria del Departamento de Producción Animal del Servicio de Investigación Agraria de la Diputación General de Aragón, por su cooperación en los momentos "críticos" en la realización del presente trabajo.

A la Dra. Monserrat Barberán Pelegrín, profesor

titular del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, por su excelente cooperación en el trabajo de Anatomía Patológica y fotográfico.

A D. Santiago Lázaro Gomez, laboral del Departamento de Producción Animal del Servicio de Investigación Agraria de la Diputación General de Aragón, por su gran esmero en el cuidado y manejo de los animales experimentales utilizados y por su gran ayuda en la toma y procesado de muestras de los mismos.

A todos los miembros del Departamento de Microbiología de la Universidad de Navarra, por su colaboración amistosa, y particularmente a D. Jose Ignacio Riezu-Boj por su gran ayuda en la realización de determinadas técnicas utilizadas en este trabajo.

A la Unidad de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, por su cooperación en esta tesis.

A todos muchas gracias.



INDICE

1. INTRODUCCION Y OBJETIVOS.....	1
2. REVISION BIBLIOGRAFICA.....	5
2.1. Estructura antigénica del género <u>Brucella</u> ...	
2.1.1. Antígenos principales de la fase lisa de <u>Brucella</u>	5
2.1.2. Estructura antigénica de <u>B. ovis</u>	9
2.2. Diagnóstico.....	15
2.2.1. Fijación de Complemento (FC).....	18
2.2.2. Doble Difusión en Gel (DDG).....	20
2.2.3. ELISA.....	21
2.3. Profilaxis médica.....	23
2.4. Tratamiento.....	29
3. MATERIAL Y METODOS.....	31
3.1. Cepas bacterianas utilizadas.....	31
3.2. Antígenos.....	31
3.2.1. Obtención de la masa bacteriana para la preparación de antígenos	31
3.2.2. Preparación de antígenos.....	32
3.2.2.1. Obtención del extracto salino caliente (antígeno HS) de <u>B. ovis</u>	32
3.2.2.2. Preparación del antígeno RG de <u>B. ovis</u>	33
3.2.2.3. Preparación del antígeno protéico (antígeno SP).....	34

3.2.3. Análisis químico e inmunológico de los antígenos.....	35
3.3. Pruebas serológicas.....	36
3.3.1. Doble difusión en gel (DDG).....	36
3.3.2. Fijación del Complemento (FC).....	38
3.3.3. Rosa Bengala (RB) y Fijación del Complemento con antígenos lisos.....	40
3.3.4. ELISA.....	41
3.4. Bacteriología.....	47
3.5. Material animal utilizado.....	49
3.5.1. Experiencia n ^o 1. Puesta a punto de un ELISA con diferentes antígenos y sustratos y comparación de su valor diagnóstico con el de las pruebas DDG y FC.....	49
3.5.2. Experiencia n ^o 2. Estudio del valor inmunizante de la vacuna Rev 1 de <u>B. melitensis</u> frente a la infección por <u>B. ovis</u>	50
3.5.2.1. Experiencia 2A. Comparación de las vías de inoculación subcutanea y conjuntival para la profilaxis de moruecos jóvenes.....	51
3.5.2.2. Experiencia 2B. Inmunización de moruecos adultos.....	53
3.5.3. Experiencia n ^o 3. Determinación de la	

eficacia del tratamiento antibiótico de la infección por <u>B. ovis</u>	55
4. RESULTADOS.....	57
4.1. Resultados de la experiencia n ^o 1.....	57
4.1.1. Resultados de la estandarización del ELISA con tres preparaciones antigénicas de <u>B. ovis</u> y tres sustratos diferentes.....	57
4.1.2. Comparación del valor diagnóstico de las pruebas de Doble Difusión en Gel (DDG), Fijación del Complemento (FC) y ELISA.....	57
4.1.2.1. Doble Difusión en Gel.....	57
4.1.2.2. Fijación del Complemento....	63
4.1.2.3. ELISA.....	65
4.1.3. Resultados comparativos de las técnicas DDG, FC y ELISA con los antígenos de <u>B. ovis</u>	73
4.2. Resultados de la experiencia n ^o 2A: Comparación de las vías de inoculación subcutánea y conjuntival de la vacuna Rev 1 para la profilaxis de moruecos jóvenes.....	73
4.2.1. Seguridad de la vacuna.....	75
4.2.2. Evolución de la respuesta humoral tras la vacunación frente a antígenos de la fase lisa de <u>Brucella</u>	75
4.2.3. Evolución de la respuesta humoral	

frente a antígenos de la fase rugosa, tras la infección experimental con <u>B.</u> <u>ovis</u>	77
4.2.4. Resultados clínicos, bacteriológicos y anatomopatológicos tras la infección experimental.....	79
4.3. Resultados de la experiencia n°2B: Comparación de las vías de inoculación subcutánea y conjuntival de la vacuna Rev 1 para la inmunización de moruecos adultos....	89
4.3.1. Seguridad de la vacuna.....	89
4.3.2. Evolución de la respuesta humoral tras la vacunación frente a los antígenos de la fase lisa.....	89
4.3.3. Evolución de la respuesta humoral en DDG frente a antígenos de la fase rugosa tras la infección experimental con <u>B. ovis</u>	92
4.3.4. Resultados clínicos, bacteriológicos y anatomopatológicos tras la infección experimental.....	94
4.4. Resultados de la experiencia n° 3: Eficacia del tratamiento antibiótico de la infección por <u>B. ovis</u>	100
4.4.1. Evolución de la respuesta humoral tras la infección experimental y tras el tratamiento.....	100

4.4.2. Resultados clínicos, bacteriológicos
y anatomopatológicos..... 100

5. DISCUSION..... 109

6. BIBLIOGRAFIA..... 131





INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Diluciones óptimas de suero y conjugado para la realización de la prueba ELISA con los antígenos HS, RG y SP y los sustratos 5-AS, ABTS y OPD.....	62
Cuadro 2. Resultados serológicos en la prueba de DDG con los antígenos HS, RG y SP, utilizando 83 sueros controles positivos y 83 negativos.....	64
Cuadro 3. Resultados serológicos en la prueba de FC con los antígenos HS, RG y SP, utilizando 83 sueros controles positivos y 83 negativos.....	66
Cuadro 4. Resultados serológicos en la prueba ELISA con los diferentes sustratos y antígenos utilizando 83 sueros controles positivos y 83 negativos.....	71
Cuadro 5. Resultados serológicos comparativos de las técnicas ELISA (ABTS), DDG y FC con el antígeno HS y los 83 sueros controles positivos y negativos.....	74
Cuadro 6. Alteraciones testiculares, infección bacteriológica y grado de la misma en los animales jóvenes vacunados subcutánea o conjuntamente con Rev 1 y sometidos a infección experimental con <u>B. ovis</u> .	

	(Experiencia 2A).....	80
Cuadro 7.	Distribución de <u>B. ovis</u> en los órganos de los moruecos que resultaron infectados tras la inoculación experimental en los animales jóvenes vacunados con Rev 1. (Experiencia 2A).....	82
Cuadro 8.	Grado de las lesiones microscópicas observadas tras la infección experimental en los animales jóvenes vacunados subcutánea o conjuntivamente con Rev 1. (Experiencia 2A).....	84
Cuadro 9.	Alteraciones testiculares, infección bacteriológica y grado de la misma en los animales adultos vacunados subcutánea o conjuntivamente con Rev 1 y sometidos a infección experimental con <u>B. ovis</u> . (Experiencia 2B).....	95
Cuadro 10.	Distribución de <u>B. ovis</u> en los órganos de los moruecos adultos vacunados subcutánea o conjuntivamente con Rev 1 que resultaron infectados tras la inoculación experimental. (Experiencia 2B).....	97
Cuadro 11.	Grado de las lesiones microscópicas observadas tras la infección experimental en los moruecos adultos vacunados subcutánea o conjuntivamente con Rev 1. (Experiencia 2B).....	99

Cuadro 12. Excreción seminal de <u>B. ovis</u> durante el tratamiento antibiótico de los moruecos infectados experimentalmente. (Experiencia 3).....	103
Cuadro 13. Alteraciones testiculares, infección bacteriológica y grado de la misma en los moruecos infectados por <u>B. ovis</u> y tratados con antibióticos. (Experiencia 3).....	104
Cuadro 14. Distribución de <u>B. ovis</u> en los órganos de los moruecos infectados tras el tratamiento con antibióticos. (Experiencia 3).....	106
Cuadro 15. Grado de las lesiones microscópicas observadas en los moruecos infectados por <u>B. ovis</u> y tratados con antibióticos (Experiencia 3).....	107

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Determinación de la dilución óptima de suero en el test ELISA con el antígeno HS y los sustratos 5-AS (Fig. A), ABTS (Fig. B) y OPD (Fig. C).....	58
Figura 2. Determinación de la dilución óptima de suero en el test ELISA con el antígeno RG y los sustratos 5-AS (Fig. A), ABTS (Fig. B) y OPD (Fig. C).....	59
Figura 3. Determinación de la dilución óptima de suero en el test ELISA con el antígeno SP y los sustratos 5-AS (Fig. A), ABTS (Fig. B), y OPD (Fig. C).....	60
Figura 4. Determinación de la dilución óptima de suero en el test ELISA con antígeno HS-V y 5-AS como sustrato.....	61
Figura 5. Distribución de las densidades ópticas de la dilución óptima de los sueros positivos y negativos en el test ELISA con el antígeno HS y los sustratos 5-AS (Fig. A), ABTS (Fig. B) y OPD (Fig. C).....	67
Figura 6. Distribución de las densidades ópticas de la dilución óptima de los sueros positivos y negativos en el test ELISA con el antígeno RG y los sustratos 5-AS (Fig. A), ABTS (Fig. B) y OPD (Fig. C).....	68

Figura 7. Distribución de las densidades ópticas de la dilución óptima de los sueros positivos y negativos en el test ELISA con el antígeno SP y los sustratos 5-AS (Fig. A), ABTS (Fig. B) y OPD (Fig. C).....	69
Figura 8. Distribución de las densidades ópticas de la dilución 1/100 de los sueros negativos y positivos en el test ELISA con el antígeno HS-V y el sustrato 5-AS.....	70
Figura 9. Evolución de la respuesta humoral en Fijación del Complemento de moruecos vacunados a los seis meses de edad con Rev 1 por vía subcutánea (Fig. A) o por vía conjuntival (Fig. B).....	76
Figura 10. Evolución de la respuesta humoral en DDG (Fig. A) y ELISA (Fig. B) con antígeno HS tras la infección experimental con <u>B. ovis</u> de moruecos jóvenes vacunados con Rev 1.....	78
Figura 11. Lesiones microscópicas en testículo.....	85
Figura 12. Lesiones microscópicas en glándulas bulbouretrales.....	86
Figura 13. Lesiones microscópicas en vesículas seminales	87
Figura 14. Lesiones microscópicas en epidídimo	88
Figura 15. Lesiones microscópicas en ampollas del conducto deferente.	90

Figura 16. Evolución de la respuesta humoral en Fijación del Complemento de moruecos adultos vacunados con Rev 1 por vía subcutánea (Fig. A) o por vía conjuntival (Fig. B)..... 91

Figura 17. Evolución de la respuesta humoral en DDG con antígeno HS tras la infección experimental con B. ovis de moruecos adultos vacunados con Rev 1..... 93

Figura 18. Evolución de la respuesta humoral en DDG (Fig. A) y ELISA (Fig. B) con antígeno HS tras la infección experimental con B. ovis de moruecos sometidos a tratamiento antibiótico posterior..... 101



ABREVIATURAS

ABTS: 2,2'azinobis (3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid, diammonium saltz)

BSA: Seroalbúmina bovina.

BVS: Buffer Veronal Salino.

DDG: Doble Difusión en Gel.

Disociación S-R: Disociación de la fase lisa a la fase rugosa.

DO: Densidad óptica.

EDTA: Acido etilendiaminotetra-acético sal tripotásica.

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay.

FC: Fijación del Complemento.

HS: Antígeno obtenido de B. ovis por extracción salina caliente.

HS-V: Antígeno obtenido de B. ovis P.A. CO₂ dependiente (cepa virulenta) por extracción salina caliente.

IgG: Inmunoglobulina G.

KDO: Acido 2-ceto, 3 deoxioctulosónico.

LA: Acción retardada.

LPS: Lipopolisacárido.

LPS-R: Lipopolisacárido rugoso.

LPS-S: Lipopolisacárido liso.

OPD: Ortofenil-diamina.

PBS: Buffer Fosfato Salino.

PBS-Tween: Buffer Fosfato Salino con Tween-20.

PME: Proteínas de membrana externa.

RB: Rosa de Bengala.

Rev 1: Cepa vacunal de Rev 1 obtenida de B. melitensis.

RG: Antígeno obtenido de B. ovis por extracción con cloroformo-éter de petróleo-fenol.

r.p.m.: Revoluciones por minuto.

SFE: Suero Fisiológico Estéril.

SP: Antígeno obtenido de B. ovis por extracción salina en frío.

TSB: Caldo Tripticasa Soja.

UI: Unidades Internacionales.

UFC: Unidades Formadoras de Colonia.

VCN: Inhibidor con Vancomicina, Colistina y Nistatina utilizado para el aislamiento selectivo de B. ovis.

RESUMEN

En el presente trabajo se ha puesto a punto una prueba inmunoenzimática (ELISA) de tipo indirecto para el serodiagnóstico de la infección por B. ovis, utilizando tres extractos antigénicos de B. ovis y tres sustratos diferentes. Los antígenos utilizados fueron el obtenido por extracción salina caliente (HS), el extraído mediante éter de petróleo, cloroformo y fenol (RG) y el obtenido por extracción salina fría (SP). Los sustratos utilizados fueron el 5-AS (ácido 5-amino-hidroxibenzoico), el ABTS (2,2'azinobis, 3- ethylbenzthiazoline sulfonic acid, diammonium saltz) y OPD (Ortofenil-diamina). Los sueros control analizados pertenecían a 83 animales con cultivo positivo de B. ovis y a 83 animales libres de Brucella. Los mejores resultados se obtuvieron con el antígeno HS y los sustratos 5-AS y ABTS (97,59 p. 100 de sensibilidad y 100 p. 100 de especificidad), aunque las diferencias entre los valores de especificidad y sensibilidad obtenidos con los antígenos HS y RG y los diferentes sustratos no fueron estadísticamente significativas. El antígeno SP no dió buenos resultados en esta prueba. Pese a no apreciarse diferencias significativas estadísticamente, el sustrato ABTS presentó la mejor

resolución permitiendo incluso la interpretación visual de los resultados.

La comparación del valor diagnóstico del ELISA con el de las pruebas serológicas de Fijación de Complemento (FC) y Doble Difusión en Gel (DDG) utilizando los tres antígenos y los mismos sueros controles mencionados, no evidenció diferencias muy significativas estadísticamente. El antígeno HS proporcionó los mejores índices de sensibilidad y especificidad en las tres pruebas estudiadas. El antígeno RG no dió resultados en DDG y el antígeno SP tampoco se consiguió utilizar en la FC. La sensibilidad del ELISA con el antígeno HS fue superior a la obtenida en DDG (96,38 p. 100) y FC (92,77 p. 100) con el mismo antígeno. La asociación de las pruebas de DDG y ELISA resultó en la máxima sensibilidad (100 p. 100). Sin embargo, la FC no mejoró la sensibilidad individual de las otras pruebas. Las tres pruebas estudiadas no dieron resultados falsos positivos con los 83 sueros de los animales libres de Brucella.

En la segunda parte del trabajo, se ha realizado un ensayo para determinar la respuesta serológica y la eficacia protectora frente a B. ovis de la vacuna Rev⁻ de B. melitensis cuando se administra en moruecos jóvenes (6 meses) o adultos (13 meses) por las vías de inoculación subcutánea o conjuntival.



La cepa Rev 1 resultó inocua en todos los animales (jóvenes y adultos) vacunados y no produjo alteraciones testiculares ni efectos secundarios indeseables. La respuesta humoral tras la vacunación de los animales jóvenes fue de menor intensidad y más corta duración en los moruecos vacunados conjuntamente que en los animales vacunados subcutáneamente. Mientras que todos los animales vacunados conjuntamente eran negativos en FC a los 4 meses de la vacunación, un 100 p. 100 de los vacunados por vía subcutánea daban resultados positivos en FC. Los 11 (100 p. 100) carneros vacunados subcutáneamente y 7 de los 10 (70 p.100) animales vacunados conjuntamente quedaron protegidos frente a una dosis de B. ovis capaz de infectar a los 6 animales utilizados como testigos no vacunados. En conjunto, la vacuna Rev 1 protegió al 85,7 p.100 de los animales vacunados. En los animales que resultaron infectados, el grado infección bacteriológica y de las lesiones histológicas fue menor en los animales vacunados que en los testigos no vacunados.

En el caso de los animales adultos vacunados con Rev 1, se produjo también una respuesta humoral menos intensa y de más corta duración en los carneros vacunados conjuntamente que en los vacunados por vía subcutánea, aunque las diferencias no fueron tan notorias como en el

caso anterior. Los 10 moruecos adultos vacunados conjuntivamente y 5 de los 9 (55,56 p. 100) animales vacunados por vía subcutánea, quedaron protegidos frente a 3 inoculaciones sucesivas de B. ovis capaces de infectar a los 6 animales utilizados como testigos no vacunados. De nuevo, los animales vacunados de los que se aisló B. ovis presentaron un grado menor de infección bacteriológica y de lesiones anatomopatológicas que los animales testigos.

En la parte final del trabajo, se ha evaluado la eficacia curativa de dos tipos de tratamiento antibiótico frente a la infección por B. ovis. Esta experiencia se realizó con 24 animales infectados experimentalmente por B. ovis. Doce de estos animales recibieron 8 inyecciones intramusculares (una inyección cada tres días de intervalo) de 20 mg/Kg de Terramicina LA. Otros 12 animales fueron sometidos al mismo tratamiento pero combinado con una inyección diaria de Sulfato de Dihidroestreptomicina (20 mg/Kg) durante 21 días. El tratamiento combinado eliminó B. ovis de 11 de los 12 (91,6 p. 100) moruecos tratados mientras que sólo 4 de los 12 (33,3 p. 100) animales tratados con Terramicina sólo fueron bacteriológicamente negativos. Ninguno de los dos tratamientos curó las epididimitis clínicas presentes en 2 animales antes del tratamiento. Sin embargo, varios de los animales bacteriológicamente negativos tras el

tratamiento combinado, presentaron lesiones anatomopatológicas graves en las ampollas del conducto deferente y en el epidídimo, limitando la eficacia del tratamiento.

SUMMARY

An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) has been carried out with three antigenic extracts of B. ovis and three different substrates for the serological diagnosis of B. ovis. The antigens used were obtained by hot saline extraction (HS), by petroleum-ether, chlorophorm and phenol (RG) and by cold saline extraction (SP). The substrates used were 5-AS (5-amino-hydroxybenzoic acid), ABTS (2,2 azinobis, 3-ethylbenzthi azoline sulfonic acid, diamonium saltz) y OPD (phenylenediamine, dihydrochloride). Sera used as control were obtained from 83 B. ovis-infected rams and 83 Brucella-free animals.

The best results were obtained with HS antigen and 5-AS and ABTS as sustrates (97.59 % of sentivity and 100 % specificity). However the difference between the values obtained with HS and RG antigens and the different substrates were not significant. The SP antigen did not give consistent results in this study. Though no significant differences were found, ABTS substrate gave the best resolution even permitting a visual interpretation of results.

When comparing the diagnostic value of ELISA with that of the other serological tests such as FC and DDG, using

the same antigens and control sera, not significant differences were obtained. The HS antigen gave the best degrees of sensitivity and specificity. The RG did not work properly in DDG and the SP antigen did not fix complement in spite of several conditions tested. The ELISA test with HS antigen gave superior sensitivity than DDG (96.38 %) and CF (92.77 %) with the same antigen. However, FC did not improve the individual sensitivity of the other tests. Neither of the three test gave false positive results with the 83 Brucella-free control animals.

In the second part of this work both, the serological response and efficacy of B. melitensis Rev 1 vaccine for the prophylaxis of B. ovis were evaluated when inoculated to both young (6 months) and adult rams (13 months) by subcutaneous or conjuntival routes.

Rev 1 strain was innocuous in all vaccinated animals and did not produce testicular alterations and unfavourable sequelae. The humoral immune response after vaccination in young rams was of low intensity and of short duration in those vaccinated by conjuntival route than in those vaccinated subcutaneously. All the rams vaccinated by conjuntival route were negative by the CF test 4 months after vaccination, while 100 % of those vaccinated subcutaneously were positive in the same test.



Eleven of young rams (100 %) vaccinated subcutaneously and seven (70 %) vaccinated by conjuntival route developed protection against a challenge of B. ovis, able to infect all unvaccinated controls employed. The level of bacteriological infection and pathological alterations were lower in the vaccinated group than in the control one.

As in young rams, the humoral immune response was also lower and shorter in adult rams vaccinated by conjuntival route than in those vaccinated subcutaneously, although the difference was not as significant as in young rams. Ten adult rams (100 %) vaccinated by conjuntival route and five (55.56 %) of the rams vaccinated subcutaneously developed a high degree of protection when challenged with three consecutive inoculations of B. ovis that infected the six animals used as controls. Again, vaccinated animals with positive B. ovis isolation had lower level of infection and of pathological alterations than the controls.

In the last part of this work we have evaluated the efficacy of two antibiotic treatments against B. ovis infection. Twenty four animals were experimentally infected with B. ovis. Twelve animals recieved intramuscularly eight inoculations vaccines (once every three days) of 20 mg / Kg of Terramycin / LA. The other

twelve animals recieved the same treatment but associated ion with a daily dose of 20 mg / Kg of Dihydrostreptomycin sulfate for 21 days.

B. ovis was not isolated in eleven rams (91.6%) treated with the combined regime, while only four of the rams treated with Terramycine alone were bacteriologically cured. Clinical epididymitis, present in two animals before treatment was started, was not cured with any of the two treatments. In addition several bacteriologically cured animals presented severe histopathological lesions in ampullae ductus deferens and in epididymis limiting the efficacy of the treatment.

1. INTRODUCCION Y OBJETIVOS

Dentro de los proyectos de investigación aplicada números 949/82, 2910/83 (CAICYT) y 2085 (CONAI - DGA) se han llevado a cabo estudios sobre desarrollo y puesta a punto de técnicas de diagnóstico serológico y pautas de profilaxis y control de la infección por Brucella ovis, diagnosticada por primera vez en España en 1982 (19).

En un trabajo anterior (22) se llevaron a cabo experiencias preliminares sobre diagnóstico, incidencia en Aragón y profilaxis vacunal de la citada enfermedad. En dicho trabajo se realizó una caracterización parcial de los antígenos de B. ovis que contenían lipopolisacárido y se comparó su valor diagnóstico en dos pruebas serológicas (Doble Difusión en Gel y ELISA). Con la prueba más adecuada (Doble Difusión en Gel con extracto salino caliente como antígeno) se realizó un estudio epidemiológico en las tres provincias aragonesas para determinar la incidencia de la infección. Dada su enorme difusión (más del 11 p.100 de los 2.398 moruecos analizados dieron serología positiva y casi el 50% de las 157 ganaderías examinadas poseían uno o varios animales positivos), la parte final del trabajo se orientó a poner a punto una pauta de profilaxis vacunal, única alternativa razonable para comenzar el control de la enfermedad. La inmunización de

moruecos de 3 - 5 meses de edad por vía subcutánea con la vacuna viva Rev 1 de B. melitensis, protegió adecuadamente a los animales frente a una inoculación experimental capaz de infectar a todos los animales no vacunados que se utilizaron como control (23).

Dado el carácter preliminar de la información obtenida, los proyectos de investigación mencionados han tratado de profundizar en el diagnóstico de la infección y sobre todo en el control de la misma mediante técnicas de profilaxis médica. El presente manuscrito es una recopilación de los resultados obtenidos en los últimos tres años de trabajo, en los que se han tratado de abordar los objetivos siguientes:

1. Comparar el valor diagnóstico de tres extractos antigénicos de B. ovis en la prueba cualitativa de Doble Difusión en Gel (DDG) y en las pruebas de Fijación del Complemento (FC) y ELISA (Enzyme - linked immunosorbent assay), previa puesta a punto de las mismas. Estas dos últimas pruebas podrían permitir una interpretación cuantitativa y automatizable de los resultados serológicos.

La finalidad de este objetivo consiste en aportar información adicional a la existente sobre qué antígeno(s) o qué prueba(s) son los que tienen mejor

sensibilidad y especificidad para ser aplicados al diagnóstico de rutina de la enfermedad en nuestro país. En el momento presente, no existe ninguna prueba oficial y tan sólo las Comunidades Autónomas Vasca, Navarra y Aragonesa realizan algún tipo de diagnóstico serológico de la infección, basado en la prueba de Doble Difusión en Gel con antígenos solubles obtenidos de B. ovis mediante extracción salina por el calor.

2. Determinar la eficacia protectora de la vacuna Rev 1 de B. melitensis en moruecos jóvenes y adultos cuando se aplica por vía subcutánea o cuando se aplica a través de la vía conjuntival.

La finalidad de este objetivo es obtener una pauta profiláctica para ser aplicada en moruecos de cualquier edad con el mínimo de interferencia en el diagnóstico serológico de la infección por B. melitensis, presente igualmente en el ganado ovino de nuestro país.

3. Determinar la efectividad del tratamiento antibiótico prolongado sobre la infección por B. ovis.

La información disponible sobre el tratamiento antibiótico de la infección es prácticamente inexistente. Alguno de los programas de selección genética llevados a cabo en nuestro país han contribuido

a la consecución de moruecos de excepcional valor genético que pueden llegar a infectarse. El elevado precio de mercado de estos animales podría justificar el, a priori, elevado coste de un tratamiento antibiótico prolongado.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. Estructura antigénica del género Brucella

2.1.1. Antígenos principales de la fase lisa de Brucella

Estos microorganismos gramnegativos poseen una envoltura celular que rodea al citoplasma, constituida por una membrana citoplasmática, un espacio periplásmico que contiene peptidoglicano y una membrana externa formada por una bicapa lipídica en la que se insertan diversas proteínas (61).

La parte exterior de la membrana externa es la única región bacteriana en contacto con el medio y contiene distribuidos asimétricamente fosfolípidos, proteínas y un lipopolisacárido (LPS) (119). En las bacterias en fase lisa, este LPS cubre la mayor parte de la superficie externa, siendo el antígeno inmunodominante (49).

El LPS, como en otras bacterias gramnegativas, es una macromolécula anfótera que contiene 3 partes bien diferenciadas: el lípido A, la cadena polisacáridica terminal y núcleo oligosacárido central (49, 104, 113). El lípido A es un glucolípido

que esta inserto en la doble capa lipídica de la membrana externa de la bacteria, y por lo tanto no expuesto al medio externo, constituyendo la parte hidrófoba del LPS. La cadena terminal es un polímero de polisacáridos que constituyen los determinantes antigénicos responsables de la especificidad serológica del LPS y de las especies o serotipos respectivos de las bacterias. Esta cadena terminal expuesta al medio externo, posee una fuerte naturaleza hidrofílica que confiere solubilidad a la molécula de LPS. El núcleo oligosacarídico une el Lípido A y la cadena terminal de polisacáridos.

El LPS de Brucella presenta diferencias importantes con respecto al de las enterobacterias. Así, el análisis químico del LPS de Brucella ha demostrado la presencia de ácidos grasos de mayor peso molecular que los correspondientes de las enterobacterias (113). En la composición del polisacárido es destacable la ausencia de heptosa y la presencia de azúcares como la manosa, glucosa, quinovosamina, glicosamina y KDO (ácido 2-ceto, 3-deoxioctulosónico)(115). Por otro lado, cuando se aplica el método de extracción agua-fenol (168), al contrario de lo que ocurre con el LPS de las enterobacterias, el LPS de las brucelas en fase lisa es extraído en la fase fenólica (104, 113). El LPS así obtenido, presenta una alta proporción de proteínas

contaminantes (113, 83).

En general, la composición protéica de la membrana externa parece ser más compleja en el género Brucella que en otros gramnegativos (20), existiendo además fuertes interacciones entre las proteínas y el LPS (118, 157). La membrana externa de Brucella contiene una variedad reducida de proteínas (117, 157), con tres grupos principales (168): el grupo 1 (85-94 K), de función desconocida; el grupo 2 (36-43 K), que equivale a las porinas o proteínas matriciales de E. coli (60, 118, 157); y el grupo 3 (24-30 K), semejante a la proteína OmpA de E. coli (157). Existe también una lipoproteína semejante a la descrita en E. coli (79, 80). Aunque estas proteínas son compartidas por todas las especies de Brucella, parecen existir diferencias cuantitativas en los grupos 2 y 3 entre las especies del género (141).

Las envolturas celulares del género Brucella poseen como fosfolípidos mayoritarios fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y cardiolipina (150). Recientes datos demuestran además, que la membrana externa de B. melitensis esta enriquecida en fosfatidilcolina (119). Ambas características diferencian las brucelas de las otras bacterias gramnegativas, en la mayoría de la cuales la



fosfatidiletanolamina es el fosfolípido mayoritario. Aún cuando los fosfolípidos no son antigénicos por si mismos, es posible que modulen la respuesta inmune.

La composición del peptidoglicano o mureína de género Brucella parece similar a la de otros gramnegativos (61), aún cuando pudieran existir diferencias de tipo cuantitativo. La capa de peptidoglicano parece más gruesa y mas íntimamente unida a la membrana externa en el género Brucella que en E. coli, cuando son visualizados por microscopía electrónica (61).

Los componentes citoplasmáticos solubles no ofrecen ninguna particularidad con respecto a los de otros gramnegativos. Así, en el citoplasma de Brucella las proteínas solubles (fundamentalmente enzimas) y los ribosomas son los componentes antigénicos principales. El análisis por inmunoelectroforesis de los mismos, revela que son comunes a todas las especies del género, pero inmunológicamente distintos de los otros gramnegativos, incluidos aquellos con cuyo LPS existe reacción cruzada (50, 52).

Como la síntesis del LPS tiene lugar en el citoplasma sobre la cara interior de la membrana interna, no es infrecuente la presencia en el citoplasma



de precursores biosintéticos del LPS. Estos precursores de naturaleza polisacárida, están desprovistos de la parte lipídica del LPS, no son inmunogénicos pero reaccionan con anticuerpos específicos anti-LPS (56) y son por ello conocidos como haptenos nativos (51, 113, 114). En los extractos citoplasmáticos los haptenos nativos siempre son componentes minoritarios (119).

2.1.2. Estructura antigénica de B. ovis.

Debido a su naturaleza permanentemente rugosa, B. ovis posee una superficie celular distinta de la de B. abortus, B. melitensis y B. suis (48, 49, 52) y algunas propiedades particulares desde el punto de vista antigénico (127). Las principales diferencias con las especies lisas derivan de la estructura de sus correspondientes lipopolisacáridos. B. ovis carece del lipopolisacárido liso (LPS-S) específico de brucelas lisas (58, 115). El LPS de B. ovis, al faltarle parte de la cadena polisacárida terminal presente en la fase lisa, tiene una naturaleza más hidrofóbica que el LPS-S, siendo extraído en la fase acuosa y también en la fase fenólica cuando se aplica el método fenol-agua (168).

Al igual que el LPS de los mutantes rugosos de B. abortus y B. melitensis, el LPS de B. ovis puede extraerse a partir de células enteras mediante

disolventes orgánicos (2, 74, 114, 131). El método de extracción con éter de petróleo, cloroformo y fenol, desarrollado originalmente para obtener el LPS de los mutantes rugosos de enterobacterias (74), es el de elección para obtener unas preparaciones de LPS esencialmente libres de proteínas y ácidos nucleicos (2, 131, 134). Sin embargo, la elevada hidrofobicidad de este LPS representa un problema para su uso en numerosas pruebas serológicas.

La estructura del LPS de B. ovis no ha sido todavía aclarada por completo. A pesar de que contiene azúcares que también están presentes en el núcleo-lípido A del LPS de otras brucelas (116), el LPS de B. ovis da sólo una reacción de identidad parcial con el LPS de B. canis o con el de los mutantes rugosos de B. abortus y B. melitensis (116). Esta misma reacción se observa con el LPS presente en los extractos salinos de B. canis y de los mutantes rugosos de B. abortus y B. melitensis (52). Todas estas observaciones sugieren la presencia de determinantes antigénicos específicos de especie en el LPS de B. ovis.

Es ampliamente aceptado que las infecciones por brucelas lisas no suscitan la producción de anticuerpos frente a los antígenos de superficie de las cepas rugosas. Sin embargo, ovejas con infección

natural por B. melitensis o vacunadas con la cepa lisa Rev 1 de B. melitensis, presentan una doble respuesta humoral en pruebas de precipitación en gel frente a los antígenos de superficie propios de las especies lisas de Brucella y también frente a los de la fase rugosa (22). Esta reacción cruzada ha sido observada así mismo en un ELISA con LPS de B. ovis como antígeno y sueros de ovejas y cabras con infección natural por B. melitensis y también de vacas infectadas por B. abortus (132). En el caso inverso, sueros de algunos moruecos infectados por B. ovis pueden presentar reacciones cruzadas cuando se analizan en un ELISA con antígeno LPS obtenido de B. melitensis en fase lisa (132). Los diferentes estados de agregación de los lipopolisacáridos en soluciones acuosas (el LPS liso forma micelas largas y el LPS rugoso se presenta en forma dispersa), la existencia de determinantes antigénicos comunes a ambos lipopolisacáridos (lípidos A y núcleo); así como la existencia de proteínas comunes en la membrana externa (141), pueden explicar parcialmente estas discrepancias serológicas. En pruebas de precipitación en gel, por ejemplo, el LPS liso se encuentra formando micelas y los determinantes del lípido A - núcleo no están expuestos y por lo tanto, los anticuerpos anti LPS rugoso no lo precipitan. Por el contrario, la reacción cruzada se pone en evidencia cuando el LPS se adsorbe a una fase sólida, como ocurre en muchas pruebas inmunoenzimáticas

(131).

La posible existencia de disociación S-R (lisa-rugosa) de las especies lisas de Brucella dentro del organismo del animal que parasitan, podría contribuir también a la explicación de la doble respuesta serológica. El aislamiento directo de colonias rugosas en cabras infectadas por B. melitensis (8), podría dar consistencia a esta hipótesis.

Cuando suspensiones de B. ovis en suero salino se someten a una extracción en autoclave, las preparaciones solubles obtenidas contienen un determinante antigénico principal que precipita con los anticuerpos anti - LPS rugoso (52, 124) y que da una reacción de identidad con el LPS obtenido por el método de Galanos et al.(74) del mutante rugoso B. abortus 45/20 (52). Por estas razones, al extracto antigénico así obtenido se le ha conocido universalmente como "antígeno específico rugoso" y denominado antígeno HS (Hot saline antigen). La caracterización química e inmunológica de estos extractos ha mostrado que contienen LPS, proteínas de membrana externa (principalmente del grupo 3) y otros componentes de la membrana externa (3, 22, 131). Por lo tanto, estos extractos contienen determinantes específicos del LPS de B. ovis y otros componentes antigénicos, algunos de los

cuales son compartidos con B. melitensis y otras brucelas (3, 141). La existencia de tales componentes podría explicar las reacciones serológicas cruzadas mencionadas anteriormente (3, 131).

Los extractos HS o preparaciones antigénicas obtenidas por metodos similares, han sido ampliamente utilizadas para el diagnóstico serológico de la infección por B. ovis. Su solubilidad en agua y su alto contenido en determinantes antigénicos de importancia, explican sus buenos resultados en las pruebas serológicas en las que se han utilizado. Sin embargo, en países donde también existe la infección por B. melitensis, como por ejemplo ocurre en España, la especificidad del diagnóstico con este antígeno tiene que ser interpretada en conjunto con los resultados de las pruebas serológicas para brucelas lisas (131).

Además del LPS, la membrana externa de B. ovis contiene tres grupos de proteínas mayores (132), que como ya se ha mencionado, están también presentes en la membrana externa de otras especies de Brucella (132, 141). Sin embargo, estas proteínas de membrana externa estan expuestas más superficialmente en B. ovis que en células lisas de B. melitensis (132). Esta observación explicaría el hecho de que algunas proteínas de membrana externa de B. ovis, a diferencia de lo que ocurre con

las de B. melitensis, podrían jugar un papel antigénico importante en la epididimitis infecciosa del morueco (131).

Existe muy poca información en B. ovis sobre los antígenos no expuestos en la superficie celular. Como ya ha sido mencionado, los antígenos citoplasmáticos solubles son comunes para todas las especies del género Brucella (22, 48) e intervienen en las reacciones de hipersensibilidad retardada en las infecciones por B. ovis y B. melitensis (71, 92, 94). Los antígenos citoplasmáticos obtenidos del mutante rugoso 115M de B. melitensis por el método de extracción salina fría (14), son indistinguibles de los obtenidos de B. ovis por el mismo método en las pruebas de precipitación en gel frente a antisueros de B. ovis (22). Estos antígenos han sido poco estudiados desde el punto de vista diagnóstico. Cuando se usan en pruebas de precipitación en gel pueden tener un cierto valor diagnóstico en ganado ovino infectado por B. melitensis (151) y en pacientes humanos afectados por formas crónicas de brucelosis (54). No existe información sobre su valor diagnóstico en el caso de la infección por B. ovis en ganado ovino.

Se desconoce el papel desempeñado por el peptidoglicano y otros componentes del espacio

periplásmico y membrana interna en la respuesta inmune frente a B. ovis. Hasta el momento presente no ha sido demostrada la existencia de polisacáridos hapténicos en B. ovis.

2.2. Diagnóstico

La palpación del contenido escrotal es una técnica utilizada para la identificación de los moruecos infértiles (39, 88). Este método detecta los cambios patológicos que disminuyen o anulan la fertilidad, es barato y no requiere preparación especial para realizarlo. Aunque ha sido aplicado al control de la infección por B. ovis (103, 109, 120, 160), es muy difícil diagnosticar esta enfermedad exclusivamente por palpación genital, ya que las lesiones de epididimitis tienen múltiples etiologías en ganado ovino (11, 21, 20, 24, 26, 36, 37, 43, 47, 62, 65, 89, 90, 106, 138, 139, 143, 145, 153, 155, 156, 162, 169, 170, 174, 175). Además, animales que presentan epididimitis palpables pueden mostrar palpaciones clínicas normales con el paso del tiempo, a pesar de que el examen histológico de sus órganos genitales demuestre lesiones graves en el epidídimo (22). Por otra parte, los órganos afectados con mayor frecuencia por la bacteria son las glándulas sexuales accesorias, que no son susceptibles de palpación. En un amplio estudio llevado a cabo en



nuestro país casi la mitad de los animales infectados por B. ovis no presentaban alteraciones detectables mediante palpación de su aparato genital (22).

El aislamiento del agente etiológico es la única prueba irrefutable para confirmar la existencia de la infección. La muestra más adecuada para el aislamiento de B. ovis de animales vivos es el semen, que puede ser fácilmente obtenido por medio de electroeyaculación y ser recogido en bolsas de plástico o por medio de escobillones tomados directamente del prepucio tras la eyaculación. Las muestras de semen pueden examinarse bacterioscópicamente mediante frotis teñidos con Gram o Ziehl-Neelsen (161). Los cocobacilos característicos pueden evidenciarse en muchos animales infectados (161) pero los carneros pueden estar infectados por otras bacterias de morfología similar (p.e. Chlamydia sp. (67, 138, 147) y B. melitensis (62, 95, 99)), hecho que puede conducir a diagnósticos erróneos. Las muestras de semen pueden sembrarse directamente en medios de cultivo adecuados e incubarse con 10 p. 100 de CO₂. El uso de medios de cultivo no selectivos no tiene sentido práctico por las bacterias contaminantes. El medio selectivo de Thayer-Martin modificado (25, 149), es el de elección para el aislamiento de B. ovis. Debido a dificultades prácticas (electroeyaculación, transporte de muestras, etc.) y a la existencia de animales

infectados que no excretan B. ovis por el semen (23, 88, 161, 173), el examen bacteriológico de muestras de semen tampoco es un método práctico para el diagnóstico de la infección en programas de control a gran escala. Sin embargo, puede tener un gran interés para el diagnóstico de la infección en determinadas condiciones epidemiológicas, en asociación con el diagnóstico serológico (13, 173).

Por todo lo anteriormente mencionado, la utilización de las pruebas serológicas debería ser lo más práctico y recomendable para el diagnóstico de la enfermedad.

El diagnóstico serológico de la infección por B. ovis se basa en la demostración de anticuerpos frente a los antígenos específicos de la fase rugosa. Para el diagnóstico de la infección por B. ovis han sido aplicadas, con diferente eficacia, una gran variedad de pruebas serológicas como la Aglutinación (31, 48), Hemaglutinación Indirecta (48, 133, 134), Inhibición de la Hemaglutinación (157), Inmunofluorescencia Indirecta (4, 46, 153), Doble Difusión en Gel (46, 52, 94, 121, 123), Contraelectroforesis (124), Fijación del Complemento (15, 27, 41, 46, 94, 108, 126, 136, 140, 161, 163, 164, 167, 171) y ELISA (2, 40, 59, 129, 131, 137, 146, 158, 172, 173). Las más importantes y más

ampliamente utilizadas son la Doble Difusión en Gel, la Fijación del Complemento y el ELISA.

2.2.1. Fijación de Complemento. (FC)

La FC es la técnica más usada para el diagnóstico serológico de la infección por B. ovis. Tanto la sensibilidad como la especificidad de esta prueba dependen de la naturaleza del antígeno empleado, la temperatura de incubación de la mezcla de antígeno, suero y complemento (caliente o frío) y del tiempo de incubación.

Los antígenos de B. ovis presentan con cierta frecuencia problemas de poder anticomplementario. Esta actividad anticomplementaria parece estar asociada a la presencia de células o restos celulares en las preparaciones antigénicas (42) y de acuerdo con esto, los antígenos usados en FC son mayoritariamente extractos obtenidos por calentamiento (HS) o antígenos de naturaleza similar y los productos extraídos por ultrasonidos y libres de residuos celulares (9). El antígeno HS tiene mejor sensibilidad que los extraídos por ultrasonidos (9) o que el LPS obtenido por el método de Galanos et al. (131). Además, el antígeno HS es muy específico y las reacciones cruzadas se limitarían prácticamente a las especies rugosas de Brucella que en

condiciones naturales no afectan a la oveja. Sin embargo, como ya ha sido citado anteriormente, existe la posibilidad de reacción cruzada en las infecciones naturales por B. melitensis o tras la vacunación con Rev 1 (131).

Con relación a la forma de incubación de la mezcla de antígeno, suero y complemento, no se han obtenido grandes diferencias de sensibilidad entre técnicas con fijación en caliente (37°C, 30-40 min.) o en frío (4°C, toda la noche). Sin embargo, el método frío es considerado como más sensible que el caliente para ser aplicado en programas de control (9, 38).

Por otra parte, ha sido citado que aumentando el tiempo de incubación de la mezcla de antígeno, suero y complemento hasta 60 minutos, la sensibilidad de la técnica con fijación en caliente se mejora considerablemente (142).

A pesar de que la FC presenta inconvenientes notables tales como su complejidad técnica, la necesidad de inactivar los sueros por calentamiento, la dificultad de realización con sueros hemolizados, la existencia de sueros con poder anticomplementario, de problemas de sensibilidad y especificidad (2, 46, 85, 88, 129, 137, 166, 161, 172,

173) y de fenómenos de prozona, esta técnica serológica sigue siendo la más utilizada en los programas de control.

2.2.2. Doble difusión en gel. (DDG)

La prueba de DDG se ha utilizado para la detección de anticuerpos precipitantes con diferentes preparaciones antigénicas de B. ovis. La técnica usada con mayor frecuencia es una adaptación del método de Ouchterlony (128) de difusión en gel de agar, llevada a cabo en portas de microscopía y utilizando antígeno HS (121). En esta técnica, los sueros de animales infectados por B. ovis desarrollan una línea de precipitación característica con el antígeno HS, cuya presencia o ausencia se correlaciona con los resultados de la prueba de FC con el mismo antígeno, presentando similar sensibilidad (121). Siendo una técnica de realización mucho más fácil, esta prueba serológica no ha sido aceptada universalmente al ser considerada menos sensible que la FC para los programas de control a gran escala (46, 172). Sin embargo, la falta de sensibilidad aducida podría deberse a que las condiciones de utilización de la DDG no han sido siempre las adecuadas. En primer lugar, para una realización correcta de la prueba, el antígeno HS tiene que ser titulado frente a varios sueros de animales infectados. En segundo lugar, la concentración de ClNa en los geles es esencial para

la optimización de la sensibilidad de la técnica. Los geles que contienen un 5 p. 100 de ClNa mejoran la eficiencia de los que utilizan concentraciones del 0,85 p. 100 (93). Cuando la concentración de ClNa se aumenta hasta un 10 p. 100, la sensibilidad es óptima para el diagnóstico con sueros ovinos (21).

Los anticuerpos que intervienen en DDG, al igual que los que intervienen en FC, son mayoritariamente de la clase Ig G (122). Esto podría explicar la elevada correlación que ha sido obtenida entre los resultados de FC y DDG (22, 94, 121, 123).

La DDG es una técnica fácil de realizar, barata, que puede hacerse en laboratorios poco dotados de material, incluso a nivel de campo y que no necesita personal especialmente entrenado para su interpretación. Las principales desventajas de esta prueba son que no esta estandarizada y que sus resultados sólo pueden ser interpretados cualitativamente.

2.2.3. ELISA.

El ELISA indirecto, realizado en placas de poliestireno ha sido aplicado por diferentes autores al diagnóstico serológico de la infección por B. ovis. Las principales diferencias en las distintas técnicas utilizadas residen en la clase de conjugado, en el tipo

de antígeno y en el sustrato revelador.

Como conjugados se han utilizado anti-inmunoglobulinas ovinas marcadas con peroxidasa (2, 129, 131, 137, 146, 150, 172) o con fosfatasa alcalina (108). Aunque no existen muchos datos comparativos, las diferencias de sensibilidad debidas al tipo de enzima conjugada a la inmunoglobulina no parecen ser importantes. Los sustratos más ampliamente utilizados en la prueba han sido el ácido 5-amino-hydroxibenzoico (5-AS), el ABTS (2, 2 'azinobis 3- ethylbenzthiazoline sulfonic acid, Diamonium saltz) y la Ortofenil-diamina (OPD) (2, 40, 129, 131, 137, 146, 150, 172). Aunque los datos publicados sugieren que no deben existir grandes diferencias de sensibilidad y especificidad achacables al tipo de sustrato, no se han realizado estudios comparativos que lo avalen.

Al igual que en el resto de las pruebas serológicas, la sensibilidad y la especificidad dependen mayoritariamente del antígeno usado. Los antígenos obtenidos por sonicación pueden tener problemas de especificidad (2, 131). Los extractos antigénicos del tipo HS han sido también utilizados en el ELISA dando los mejores valores de sensibilidad y especificidad en ensayos comparativos (137, 146, 172, 173). El antígeno LPS-R obtenido por el método de Galanos et al. (74)

también se ha empleado en un ELISA indirecto, dando resultados aceptables (2, 131), pero poseyendo menor sensibilidad que la obtenida en la misma prueba con el antígeno HS (131).

Aunque no han sido observadas reacciones cruzadas en el ELISA con estos antígenos y los de otros microorganismos patógenos para el ganado ovino, una importante reacción cruzada se pone en evidencia cuando el antígeno HS y el LPS-R obtenido por el método de Galanos se utilizan frente a sueros de ovejas infectadas por B. melitensis (131).

2.3. Profilaxis médica

En aquellos países donde la incidencia de la infección sea elevada y no posean una administración muy eficiente, la manera más económica, rápida y práctica de controlar la enfermedad a medio plazo es utilizar un programa adecuado de vacunación (28, 154). En estos países, la erradicación de la infección por medio del diagnóstico-sacrificio (test and slaughter) es frecuentemente antieconómica y poco viable. En estas condiciones, extrapolables a las de nuestro país, un programa de vacunación se hace indispensable para reducir la incidencia de la enfermedad antes de pasar a un programa de erradicación por diagnóstico -

sacrificio. Las vacunas más frecuentemente usadas con este propósito han sido las bacterinas de B. ovis, solas o asociadas con la cepa vacunal B 19 de B. abortus o la vacuna viva Rev 1 de B. melitensis.

Las bacterinas a base de células de B. ovis inactivadas mediante la adición de formalina y asociadas a diversos adyuvantes han sido muy utilizadas para la profilaxis médica de la infección. Las principales diferencias de inmunogenicidad de estas vacunas dependen principalmente de la clase de adyuvante que contienen. Las bacterinas adyuvadas con hidróxido de aluminio parecen tener menos eficacia protectora frente a la infección por B. ovis que las que utilizan suspensiones salino-oleosas como adyuvante (35). En general, según la bibliografía consultada, las bacterinas salino-oleosas confieren a los animales vacunados una inmunidad aceptable (16, 30, 32, 33, 34, 35, 44, '87, 110, 149), pero este tipo de vacunas presenta numerosos inconvenientes. De entre ellos, los más importantes son la necesidad de revacunaciones anuales para el mantenimiento de la inmunidad, su elevado coste y la prolongada respuesta serológica que provocan, interfiriendo en los programas de control por serología y en el manejo de los animales. La utilización de este tipo de vacunas es muy escasa en la práctica y se limita a aquellos países en los que el empleo de la vacuna Rev

l esta prohibido. En estos paises, el desarrollo de vacunas utilizando antígenos subcelulares y nuevos adyuvantes, supone un importante reto para la mejora de la profilaxis médica frente a B. ovis. Recientemente ha sido sugerido que el uso de Vitamina E en los adyuvantes podría aumentar la inmunidad conferida por las bacterinas convencionales frente a B. ovis (1).

La vacunación simultánea con bacterina y cepa B 19 por vía subcutánea en diferentes sitios del animal, confiere inmunidad frente a la infección por B. ovis (16, 30, 32, 33, 34, 35, 44, 87, 110, 148). Sin embargo, este método de vacunación presenta numerosos inconvenientes que lo hacen impracticable. La cepa viva B 19 de B. abortus puede colonizar el aparato genital de los animales vacunados provocando lesiones de epididimitis y excreción de la cepa por el semen durante prolongados periodos de tiempo (16, 154). Por otra parte, la cepa B 19 ha sido considerada responsable de casos de epifisitis y cojeras en animales vacunados (97, 165). Finalmente, este tipo de vacunación provoca una intensa respuesta serológica frente a los antígenos lisos y rugosos que interfieren el diagnóstico de las infecciones por B. melitensis y B. ovis en ganado ovino e impiden la exportación de animales a países que exigen el certificado de serología negativa (135). Además de los inconvenientes citados, este procedimiento de

vacunación confiere la misma protección que utilizando la vacunación subcutánea con bacterina salino-oleosa seguida de una revacunación subcutánea con la misma bacterina a las 24 semanas de la primovacunación (35), método con menos problemas que el anterior.

La cepa B 19 también ha sido usada como vacuna sin asociarse a bacterinas. Además de los efectos secundarios que produce, la vacuna B 19 confiere a los animales vacunados un grado de inmunidad menor que cuando se utiliza la vacuna Rev 1 de B. melitensis (154).

La vacunación con la cepa viva Rev 1 de B. melitensis (63) es probablemente, el mejor método de profilaxis médica de la infección. En condiciones experimentales y en moruecos vacunados entre los tres y cinco meses de edad con dosis de alrededor de 10^9 UFC, confiere una excelente protección elevadísima frente a inoculaciones de B. ovis virulenta capaces de infectar la totalidad de los animales testigos no vacunados que se utilizan como control (23, 69, 76, 81, 154). La revacunación con Rev 1 no parece mejorar considerablemente la inmunidad conferida por la primovacunación (23, 81), presentado además el inconveniente de producir una respuesta serológica intensa y prolongada que puede interferir en las pruebas

serológicas que se realicen con posterioridad a la vacunación.

La vacuna Rev 1 parece ser avirulenta para los carneros. La inoculación repetida varias veces en los mismos animales de alrededor de un año de edad no produce efecto patógeno alguno (66). Aunque no ha sido muy utilizada en carneros adultos, también parece comportarse como avirulenta (23). Sin embargo, la cepa Rev 1 ha sido considerada responsable de un caso de epididimitis en un animal vacunado (102).

La vacuna Rev 1 protege igualmente a los animales frente a la infección por B. melitensis (6, 64, 70, 72), presente también en nuestro país y objeto de campañas de profilaxis basadas en esta vacuna. Por lo tanto, en países donde ambas infecciones están presentes en el ganado ovino, la vacunación de moruecos de tres a cinco meses de edad con dosis completas de Rev 1 por vía subcutánea aparece como el método de elección para la profilaxis médica de la infección por B. ovis y por B. melitensis. Sin embargo, este tipo de vacunación no está exento de inconvenientes. El más importante es que la vacuna Rev 1 produce una intensa respuesta humoral que interfiere con las pruebas de diagnóstico serológico de la infección por B. melitensis, objeto de campañas de control mediante serología en los países afectados.

Hasta el momento presente no ha sido desarrollada ninguna prueba de diagnóstico que resuelva el problema de interpretación de la respuesta serológica postvacunal en ganado ovino vacunado con Rev 1 (21). Sin embargo, otros métodos de utilización de la vacuna Rev 1 han demostrado ser útiles para resolver este problema. La inoculación de la cepa Rev 1 por vía conjuntival en ovejas produce un adecuado grado de inmunidad frente a la infección por B. melitensis, con una mínima respuesta humoral frente a los antígenos lisos utilizados comúnmente en el diagnóstico serológico (70, 72). Aunque no existe ninguna referencia sobre la inoculación conjuntival de la cepa Rev 1 en moruecos, este método de vacunación podría ser efectivo para la profilaxis de B. ovis y resolver el problema de la interpretación de la serología postvacunal.

En países con elevados niveles de incidencia, los programas de profilaxis vacunal deberían aplicarse a la totalidad de los animales jóvenes y también a los adultos. Existe una información muy limitada sobre el uso de la vacuna Rev 1 en moruecos adultos para la profilaxis de la infección por B. ovis. En las dos únicas experiencias publicadas al respecto, no se citan resultados concluyentes sobre el valor protector de esta vacuna (81, 154), hecho interpretado por algunos como



una falta de eficacia de este tipo de vacunación (64). No existe tampoco información publicada sobre el uso de la vacuna Rev 1 administrada por vía conjuntival en moruecos adultos.

2.4. Tratamiento.

El tratamiento antibiótico ha sido y es utilizado con éxito para la curación de la brucelosis humana, pero rara vez se ha utilizado en el caso de la brucelosis animal. La existencia de programas de erradicación y el, a priori, alto coste del tratamiento antibiótico prolongado han sido las principales razones aducidas para su poca utilización. Sin embargo, el alto valor de mercado de algunos animales, podrían hacerlo económicamente interesante. Varios regímenes terapéuticos han sido evaluados con diferente éxito en ganado vacuno infectado por B. abortus. Una combinación de Tetraciclina retardada y Estreptomina eliminó la infección en alrededor del 70 p. 100 de las vacas infectadas (112, 125). Otros tratamientos a base de Tetraciclina sola o antibióticos encapsulados en liposomas resultaron menos eficaces en el mismo tipo de animales infectados (112, 125).

En el caso de B. ovis existen tan sólo dos referencias bibliográficas sobre el uso y efectividad

del tratamiento antibiótico de la infección. El uso combinado de Aureomicina y Estreptomicina hizo desaparecer las lesiones palpables de epididimitis y detuvo la excreción seminal de B. ovis en moruecos infectados, aunque la calidad del semen de los animales después del tratamiento fue mala (100). Un tratamiento a base de Estreptomicina sola o combinada con Sulfametazina, no tuvo efecto curativo en los animales infectados (100). Por otra parte, ha sido citado que 27 de 32 moruecos infectados que fueron sometidos a un tratamiento combinado de Estreptomicina y Tetraciclina, eran serológicamente negativos y no mostraban síntomas palpables de epididimitis a los 8 meses de finalizar el tratamiento (78).

Aunque en el momento actual el uso de la antibioterapia no es muy recomendable para ser aplicada en conjunto con programas de control, la información disponible para el caso de B. ovis no es muy consistente desde el punto de vista científico puesto que en las experiencias citadas, no se han realizado estudios bacteriológicos ni anatomopatológicos tras la necropsia de los animales tratados. Por otra parte, la existencia de carneros de gran valor económico podría hacer interesante un tratamiento antibiótico prolongado en determinadas circunstancias.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. Cepas bacterianas utilizadas

En el presente trabajo se han utilizado las cepas bacterianas siguientes:

1. B. ovis 198 REO, procedente de la colección del Departamento Interfacultativo de Microbiología de la Universidad de Navarra (Pamplona).
2. B. ovis P.A. CO₂ dependiente (virulenta), cedida por el Dr. J.M. Verger (Station de Pathologie de la Reproduction 37380. Nouzilly. Francia.)
3. B. melitensis Rev 1 PR1/81 n^o 3, cedida por el Dr. J.M. Verger (Station de Pathologie de la Reproduction. 37380 Nouzilly. Francia.)

Las cepas se conservaron liofilizadas a 4^oC. en leche descremada lactosada estéril.

3.2. Antígenos

3.2.1. Obtención de la masa bacteriana para

la preparación de antígenos

Con la cepa REO 198 se inocularon 11 matraces de 2 litros con caldo tripticasa soja (800 ml/matraz) enriquecido con 0,5 p. 100 de extracto de levadura y se incubaron a 37°C. y 250 r.p.m. durante 48/72 horas en un agitador orbital termostatado. La pureza de los cultivos se verificó mediante el examen microscópico de extensiones teñidas por el método de Gram. Las células se recogieron por centrifugación (7.500 x g, 5°C, 20 min), y se lavaron 2 veces con Suero Fisiológico Estéril (SFE). A continuación se resuspendieron en agua destilada estéril, se congelaron y se liofilizaron o bien se lavaron 2 veces con acetona fría, precipitándolas luego con 5 volúmenes de acetona y, por último, se desecaron en un rotavapor .

El cultivo de la masa bacteriana para la obtención de antígeno homólogo (HS-V), se realizó mediante siembras de la cepa B. ovis virulenta en frascos de Roux con Agar Sangre Base con 10 p. 100 de suero estéril de ternera, que se incubaron durante 4 días a 37°C en una atmósfera con un 10 p. 100 de CO₂. Las células se lavaron con SFE y se trataron igual que en la forma anterior.

3.2.2. Preparación de antígenos

3.2.2.1. Obtención del extracto salino

caliente (antígeno HS) de B. ovis (52)

Doce gramos de bacterias secas (cepa REO 198 o cepa virulenta) se resuspendieron en 150 ml. de SFE y se sometieron 30 min. a vapor fluyente en autoclave. A continuación, tras enfriar a temperatura ambiente la suspensión, los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 15.000 x g , a 4°C, durante 15 min. El sobrenadante obtenido se dializó contra agua destilada (2 x 100 volúmenes) a 4°C., se ultracentrifugó (100.000 x g, 6 h.) y el sedimento resultante se resuspendió en una pequeña cantidad de agua destilada y se liofilizó.

Cuando se obtuvo de la cepa REO 198, este material constituye el antígeno HS. Cuando se obtiene de la cepa virulenta de B. ovis, constituye el antígeno HS-V.

3.2.2.2. Preparación del antígeno RG de B. ovis (74)

Para la extracción de este antígeno se resuspendieron células desecadas de la cepa REO 198 en una mezcla de Cloroformo, Eter de petróleo y Fenol en la proporción 5/8/2 (10 gramos de células por cada 40 ml). La mezcla se homogenizó primero con una varilla de vidrio y luego con la ayuda de una batidora

Minipimer y se centrifugó a $5.800 \times g$ durante 15 min. Se recogió el sobrenadante y el sedimento se resuspendió de nuevo en igual cantidad de la mezcla Cloroformo-Eter de petróleo-Fenol y , se repitió el proceso dos veces más. Los 3 sobrenadantes obtenidos se mezclaron y se filtraron al vacío a través de papel Watman n^o 1. Tras eliminar el Cloroformo y el Eter de petróleo mediante evaporación con un rotavapor, el extracto fenólico se dejó enfriar a temperatura ambiente. El Lipopolisacárido (LPS) rugoso se precipitó añadiendo agua destilada gota a gota, cuidadosamente y con agitación continua, hasta conseguir la saturación acuosa del fenol sin llegar a formar una fase acuosa. El precipitado se recogió mediante centrifugación a $9.500 \times g$ durante 15 min. a temperatura ambiente , obteniéndose un sedimento viscoso que se lavó tres veces con fenol al 80 p.100 y dos veces más con éter etílico, eliminando este último por evaporación. El producto desecado , obtenido se resuspendió en agua destilada y se ultracentrifugó 6 h a $100.000 \times g$. El sedimento final se resuspendió en una pequeña cantidad de agua destilada y se liofilizó. Este material constituye el antígeno RG.

3.2.2.3. Preparación del antígeno protéico (antígeno SP) (14).

Células secas de B. ovis (REO 198), previamente tratadas con acetona, se

resuspendieron en una solución hipertónica (2,5 p.100 de ClNa) en una proporción peso / volumen del 5 p.100, manteniéndose 48 horas en agitación continua a 4°C. La suspensión se centrifugó a 13.000 x g durante 30 min. a 4°C. La fracción soluble presente en el sobrenadante se precipitó con 3 volúmenes de etanol frío a 4°C durante 24 h. El precipitado formado se recogió por centrifugación (5.000 x g , 4°C, 15 min) se resuspendió en agua destilada, se dializó contra agua destilada (1 x 100 volúmenes) a 4°C, se ultracentrifugó (100.000 x g, 6 h) y el sobrenadante resultante se liofilizó, constituyendo el antígeno SP.

3.2.3. Análisis químico e inmunológico de los antígenos.

La cantidad de proteína total de los antígenos obtenidos se determinó por el método de LOWRY et al. (107). El antígeno HS contenía un 44,7 - 67,1 p.100, el antígeno RG un 0,0 - 0,8 p.100 y el antígeno SP poseía más del 90 p.100.

Para la determinación del KDO (ácido 2-ceto, 3-deoxioctulosónico), componente exclusivo del LPS, se utilizó el método del ácido tiobarbitúrico, descrito por WARREN (159), empleando KDO (Sigma) y D-deoxiribosa (Sigma) como estándares. Los porcentajes de KDO para los antígenos HS, RG y SP fueron 0,3 - 1,5,

2,7 - 2,9 y menos del 0,0 p.100, respectivamente.

La caracterización inmunológica de las fracciones se determinó mediante inmunolectroforesis con sueros de animales infectados crónicamente por B. ovis. Los patrones inmunolectroforéticos de los antígenos HS, HS-V y RG se caracterizaron por una única banda de precipitación de movilidad anódica. El antígeno SP dió hasta 7 bandas de precipitación de distinta movilidad electroforética. Los antígenos HS y HS-V presentaron idénticas líneas de precipitación cuando se enfrentaron en Doble difusión en gel (DDG) frente al suero de un morueco infectado por B. ovis. Los antígenos RG, HS y HS-V al enfrentarlos en DDG con sueros de carneros infectados crónicamente presentaron identidad total entre ellos. En alguna ocasión, se observó una segunda banda de precipitación en algunos animales con los antígenos HS y HS-V, también de identidad total entre ellos. Las bandas de precipitación producidas contra el antígeno SP en DDG no presentaron identidad con las de los otros antígenos.

3.3. Pruebas serológicas.

3.3.1. Doble difusión en gel (DDG).

Este método de precipitación en gel se realizó siguiendo una modificación del procedimiento descrito por Ouchterlony (128). Los portaobjetos,

limpios y desengrasados, se cubrían con una solución de agar noble (Difco) al 1 p. 100 en Buffer Borato (pH 8,3) con 10 p. 100 de ClNa, en suficiente cantidad para obtener una capa de 2,5 mm de espesor. Después de dejar solidificar, se hacían los pocillos de 3 mm de diámetro con ayuda de un sacabocados formando un hexágono con distancias de 3 mm entre los extremos de los pocillos y un pocillo central para el antígeno. Una vez llenos los pocillos, las placas se incubaron a temperatura ambiente en cámara húmeda realizándose las lecturas a las 24 y 48 horas.

Para su uso en esta prueba el antígeno HS se diluyó en agua destilada a una concentración variable (según el lote de antígeno) entre 2 y 10 mg por ml, conservándose a 4°C con fenol al 0,5 p. 100. El antígeno RG no fue posible utilizarlo en la prueba de DDG debido a su insolubilidad. Se trató de aumentar su solubilidad con trietilamina o mediante sonicación, sin buenos resultados. Para su empleo en solución acuosa, el antígeno RG tuvo que ser disuelto en trietilamina (20 mg de RG en 10 ml de trietilamina al 50 p. 100) y adsorbido a seroalbúmina bovina por adición de la proteína (20 mg/10 ml), evaporando la trietilamina bajo vacío a 4°C con agitación constante (75). La solución acuosa resultante con RG adsorbido sobre la seroalbumina bovina se dializó y se liofilizó. A pesar de ello este antígeno

no dió resultados satisfactorios en DDG. El antígeno SP se utilizó diluido en agua destilada a una concentración variable (según el lote de antígeno) entre 5 y 10 mg/ml, conservándose congelado a -20°C .

Los sueros sanguíneos se utilizaron en esta prueba sin diluir.

3.3.2. Fijación del Complemento (FC).

La prueba se realizó mediante una modificación de la microtécnica estándar con fijación "en caliente" descrita por Sanchís y Giauffret (140). Los hematíes se obtuvieron mediante punción yugular en corderos y se recogieron con solución Alsever estéril en una proporción 1/1, dejándolos estabilizar durante una semana a 4°C antes de su utilización. Para su uso, los hematíes se lavaron dos veces con Buffer Veronal Salino (BVS) (pH 7,3) y se resuspendieron en este mismo tampón en solución al 2 p. 100. La mezcla hemolítica se preparaba diariamente mediante incubación a 37°C durante 30 min. en baño María con agitación de los hematíes al 2 p. 100, con igual volumen de suero hemolítico (Instituto Pasteur) diluido al 1/800 en BVS.

Como fuente de Complemento se utilizó suero de cobaya congelado, usándose en la prueba 2 Unidades Hemolíticas 100 p. 100 en un volumen de 25 ul,



previa titulación en presencia de antígeno.

Los sueros se diluyeron al 1/5 en BVS y se inactivaron mediante incubación a 60°C durante 30 min. en baño María. Tras enfriar a temperatura ambiente, se conservaron congelados a -20°C hasta su uso.

Los antígenos HS, RG y SP se utilizaron a partir de soluciones stock (2,5 - 10 mg/ml) y se diluyeron convenientemente en BVS previa titulación.

La técnica fue realizada sobre microplacas de poliestireno de fondo en forma de U con 96 pocillos, en la forma que se describe a continuación:

- 1) Incubación a 37°C durante 30 min. de 25 ul de suero problema (diluciones al duplo desde 1/5), con 25 ul de Complemento y 25 ul de antígeno titulado. A la dilución 1/5 de suero no se le añadió antígeno utilizándose este pocillo para detectar los sueros con poder anticomplementario. Cada día se realizaban controles de antígeno (pocillos a los que no se añadía suero), controles de Complemento (pocillos a los que no se ponía ni

suero ni antígeno) y controles de estabilidad de la Mezcla Hemolítica (en los que sólo se ponía Mezcla Hemolítica y BVS). Diariamente se utilizaron como control adicional, sueros positivos de título conocido y sueros negativos.

- 2) Adición de 50 ul de Mezcla Hemolítica y nueva incubación a 37°C durante 30 min., agitando cada 10 min.

El título del suero correspondió a la dilución más alta en la que había un 50 p. 100 o menos de hemólisis. Esta lectura se realizó inmediatamente después de la segunda incubación y tras una noche de sedimentación de las placas a 4° C. Un determinado suero era considerado positivo si el pocillo correspondiente a la dilución 1/10 presentaba un 50 p. 100 o menos de hemólisis.

3.3.3. Rosa Bengala (RB) y Fijación de Complemento con antígenos lisos.

La prueba de aglutinación rápida de Rosa Bengala (RB) se realizó sobre una baldosa, mezclando partes iguales (50 ul) de suero y antígeno standard Rosa Bengala (suministrado por el Centro Nacional de Referencia para la Brucelosis (Murcia)), y observando la

presencia de aglutinación tras 4 minutos de agitación.

La prueba de FC con antígeno liso, para la determinación de la respuesta humoral tras la vacunación, se realizó en el Laboratorio de Sanidad Animal de Zaragoza mediante una microtécnica con fijación "en caliente", utilizando antígeno estándar en fase lisa. Los títulos de 1/8 o superiores fueron considerados positivos.

3.3.4. ELISA

Se utilizó una técnica indirecta, siguiendo una modificación del procedimiento descrito por Blasco (22).

Las óptimas de concentración de antígeno, dilución de conjugado y tiempos de coloración del sustrato fueron determinados previamente, utilizando distintas diluciones de sueros controles positivos y negativos. Los antígenos empleados fueron HS, RG y SP. Todos ellos se utilizaron a una concentración de 10 ug/ml en Buffer de adsorción preparándose a partir de soluciones stock en agua destilada de 1 mg/ml, que se conservaron bien a 4°C (HG y RG) o bien a -20°C (SP). Cada sustrato se utilizó a la misma concentración para los tres tipos de antígeno empleados, pero las condiciones de utilización de cada sustrato fueron

distintas (ver más adelante, apartado 3.3.4.4.).

Como fase sólida se emplearon placas de poliestireno (Nunc) de 96 pocillos de fondo plano.

La técnica fue realizada cómo se describe a continuación:

1) Adsorción del antígeno a la placa.

Los antígenos HS y RG fueron fijados al poliestireno añadiendo 100 ul de solución de antígeno en Buffer Carbonato (0,06 M, pH 9,6) a cada pocillo e incubando durante una noche a 37°C, evitando la evaporación mediante sellado de las placas con papel adhesivo. El antígeno SP se diluyó en Buffer Fosfato Salino (PBS) (0,01 M; 0,85 p. 100 de ClNa; pH 7,2) dispensándose 100 ul por pocillo. La fijación se consiguió por evaporación total del agua del buffer mediante incubación a 45°C en una estufa de desecación. Una vez fijados los antígenos, las placas se lavaron tres veces sucesivas con PBS conteniendo un 0,05 p. 100 de Tween-20 (PBS-Tween) y se almacenaron a 4°C para su uso ulterior. Las placas así conservadas mantuvieron su estabilidad durante al menos 4 meses.

2) Adición de suero problema.

Se realizaron diluciones al duplo de



los sueros (100 ul por pocillo) en PBS-Tween (partiendo de una dilución inicial de suero 1/25 o 1/50 según el sustrato utilizado), y las placas se incubaron selladas a 37°C durante 40 min. y se lavaron tres veces sucesivas con PBS-Tween.

3) Adición de Conjugado.

Las placas se incubaron durante 40 min. a 37°C con el conjugado (100 ul por pocillo), previamente titulado. Se utilizó un antisuero comercial policlonal anti-IgG ovina obtenido en conejo y conjugado con peroxidasa (RASH/IgG, especificidad H+L, Nordic Labs.).

El conjugado no reaccionante fue eliminado mediante tres lavados con PBS-Tween

4) Adición de Sustrato.

Se ensayaron tres sustratos:

1. **5-AS** (5-amino-hydroxybenzoic acid; Merck).
2. **ABTS** (2,2'Azinobis 3-Ethylbenzthiazoline sulfonic Acid, Diamonium saltz; Sigma).
3. **OPD** (Phenylenediamine, dihydrochloride; Dakopatts).

El 5-AS se utilizó en solución al 0,08 p. 100 en agua destilada (ajustando a 6 su pH con NaOH 1 N), con 0,05 p. 100 de H_2O_2 . A cada pocillo se añadieron 100 ul y tras 20 min. a temperatura ambiente en la oscuridad, la reacción se detuvo por adición de NaOH 0,1 N (25 ul por pocillo). La lectura de la Densidad Optica (DO) se realizó a 450 nm en un espectrofotómetro automático (Titertek Multiskan).

El ABTS se utilizó en solución al 0,1 p. 100 en Buffer Citrato (0,05 M, pH 4) conteniendo un 0,004 p. 100 de H_2O_2 . A cada pocillo se añadieron 100 ul y tras incubar 15 min. a temperatura ambiente en agitación continua, la reacción se detuvo por adición de Acido Fluorhídrico 0,1 M (100 ul por pocillo). La lectura de la DO se realizó a 412 nm en el espectrofotómetro anteriormente mencionado.

La OPD se utilizó en solución al 0,008 p. 100 en Buffer Citrato Fosfato (0,15 M, pH 5) con 0,018 p. 100 de H_2O_2 . A cada pocillo se añadieron 100 ul, realizándose la incubación durante 15 min. a temperatura ambiente en la oscuridad. La reacción se detuvo por adición de ClH 1 N (50 ul por pocillo). La lectura de la DO se realizó a 490 nm en el mismo aparato.

5) Controles.

En cada placa se dejaba la columna 1 como blanco (sin añadir suero) para realizar la lectura de la DO del suero problema en relación a la DO de este blanco.

En la columna 12 de cada placa se colocaban diluciones adecuadas de 4 sueros controles positivos y 4 sueros controles negativos para detectar las posibles diferencias entre placas.

6) Estandarización de los resultados.

Una vez establecidas las condiciones precisas para cada antígeno y sustrato, se testaron diferentes diluciones de los sueros de 83 animales infectados y de 83 libres de infección (ver más adelante 3.5.1.), para determinar la dilución óptima de suero en cada tipo de prueba. Para cada uno de los tres antígenos y los tres sustratos se calcularon la media y error estándar de la DO de cada una de las diluciones de suero de las dos poblaciones control y se representaron gráficamente (FIGURAS 1, 2, 3 y 4). La dilución óptima de suero fue aquella en la que las diferencias del valor medio de DO entre la población control positiva y control negativa fueron mayores.

Para el cálculo del valor diagnóstico

(sensibilidad y especificidad) de cada tipo de ELISA, se representaron gráficamente mediante histogramas de frecuencias, los valores individuales de DO para la dilución óptima de suero de las dos poblaciones control positiva y negativa. En este tipo de representación, el solapamiento de los histogramas de frecuencias, expresa la sensibilidad y la especificidad para una determinada DO.

Para cada prueba serológica los índices de sensibilidad y especificidad se calcularon de la forma siguiente:

$$\% \text{ Sensibilidad} = \frac{a}{b} \times 100$$

$$\% \text{ Especificidad} = \frac{c}{d} \times 100$$

Siendo: a = n^o de sueros positivos obtenidos entre el total de sueros de animales infectados analizados.

b = n^o total de sueros de animales infectados analizados (n = 83).

c = n^o de sueros negativos obtenidos entre el total de sueros de animales libres de infección analizados.

d = n^o total de sueros de animales libres de infección analizados (n = 83).

3.4. Bacteriología

Para el repicado, propagación y recuento de la cepa Rev 1, se utilizaron los medios de Agar Tripticasa Soja o Agar Sangre Base. Estos medios se enriquecieron respectivamente con 0,5 p. 100 de Extracto de Levadura para el cultivo de la cepa REO 198 de B. ovis y con 10 p. 100 de suero de ternera estéril, para el cultivo de B. ovis virulenta. La concentración de microorganismos viables (UFC) se determinó mediante diluciones en Agua de Peptona al 4 p. 100 y siembras en placas en la forma descrita por Alton et al.(7).

Para el cultivo de muestras de semen o de muestras de órganos animales obtenidos por necropsia, se utilizaron el Agar Sangre (medio base de Oxoid, con un 7 p. 100 de sangre ovina, tomada asépticamente mediante tubos de vacío Venoject de 10 ml, conteniendo 0,1 ml de EDTA como anticoagulante) y el medio selectivo de Thayer-Martin modificado (25). Para su preparación, el procedimiento que se describe a continuación fue más práctico que el método estándar (25). Para preparar un litro de medio se disuelven 36 gr. de medio base GC (Gibco) en 930 ml. de agua destilada, mediante ebullición. Tras esterilizar en autoclave, y enfriar a 80°C en baño María, se añaden 70 ml de sangre ovina

(recogida asépticamente como en el caso anterior) manteniendo el medio a 80°C en agitación hasta la rotura de los glóbulos rojos, evitando la formación de espuma. A continuación, la mezcla se enfría hasta 45-50°C y se añaden 10 mg de Nitrofurantoína (Sigma) disueltos en 1 ml de NaOH 1M, y 10 ml de inhibidor VCN (Gibco o Biolife). Este inhibidor puede prepararse con 3 mg de Vancomycin (Sigma), 7,5 mg de Colistimethate (Sigma) y 12.500 U.I. de Nystatin (Gibco o Sigma).

Para intentar el aislamiento de la cepa Rev 1 de semen o de muestras tras la necropsia de los animales vacunados se utilizó el medio de Farrell (68). Para preparar un litro de medio, se pesan 30 gr. de Caldo Tripticasa Soja (TSB de Oxoid), se añaden 15 gr. de Agar Nutritivo y 15 gr. de Dextrosa. Tras disolver por ebullición y esterilizar en autoclave, el medio se enfría hasta 45°C y se añade un 5-7 p. 100 de suero de ternera estéril y la mezcla antibiótica (Oxoid). Esta mezcla inhibitoria puede ser sustituida (para un litro de medio) por 5.000 UI de Polymixin B Sulfate (Sigma), 25.000 UI de Bacitracin (Sigma), 50 mg de Cicloheximide (Sigma), 5 mg de Nalidixic Acid (Sigma), 20 mg de Vancomycin Chlorhydrate (Sigma) y 100.000 UI de Nystatin (Gibco o Sigma).

Para el aislamiento de B. ovis todas las placas

se incubaron a 37°C en una atmósfera con un 10 p. 100 de CO₂ (Incubador CO₂ ASSAB) durante 4 a 10 días. Para el aislamiento de la cepa Rev 1 las placas se incubaron en atmósfera normal.

Las bacterias aisladas se identificaron presuntivamente como Brucella por su observación colonial directa en lupa con luz incidente, tinción de colonias con cristal violeta, pruebas de catalasa, oxidasa, aglutinación con acriflavina (7) y mediante coaglutinación de estafilococos sensibilizados con suero de conejo anti-B. ovis y anti-B. melitensis (57). Para su identificación definitiva las cepas aisladas fueron enviadas a la Station de Pathologie de la Reproduction del I.N.R.A. (Dr. J.M. Verger).

3.5. Material animal utilizado.

3.5.1. Experiencia n°1. Puesta a punto de un ELISA con diferentes antígenos y sustratos y comparación de su valor diagnóstico con el de las pruebas DDG y FC.

Para esta experiencia se utilizaron los sueros de los animales siguientes:

A: 40 moruecos adultos, pertenecientes a ganaderías con infección natural y de cuyo semen se aisló B. ovis. En este caso el semen se obtuvo por electroeyaculación (Ruakura Ram Probe), siendo recogido en bolsas de plástico o directamente del prepucio mediante escobillones secos y congelado o transportado al laboratorio en un refrigerador portátil para su siembra inmediata.

B: 43 moruecos adultos inoculados experimentalmente por vía conjuntival y prepucial con 10^9 UFC de B. ovis, de los cuales se aisló B. ovis del semen o de sus órganos tras la necropsia realizada después de la infección experimental.

C: 83 moruecos de diferentes edades, libres de Brucella, nacidos en el rebaño experimental del SIA-DGA y no vacunados.

Los 83 sueros de los animales A y B componen la población de sueros controles positivos, mientras que los 83 sueros de los animales C, constituyen la población de controles negativos.

3.5.2. Experiencia n^o2. Estudio del valor inmunizante de la vacuna Rev 1 de B. melitensis frente a la infección por

B. ovis.

3.5.2.1. Experiencia 2A. Comparación de las vías de inoculación subcutánea y conjuntival para la profilaxis de moruecos jóvenes.

Para esta experiencia se utilizaron 27 moruecos de la misma edad y raza (F_1 (Romanov x Aragonesa) x Fleischschaff), pertenecientes al rebaño libre de brucelosis del SIA-DGA, distribuidos en 3 lotes y tratados de la manera siguiente:

- 11 animales fueron vacunados subcutáneamente a los 6 meses con 10^9 Rev 1.
- 10 animales fueron vacunados conjuntivalmente a los 6 meses con 10^9 Rev 1.
- 6 animales se mantuvieron como controles no vacunados.

Para determinar la seguridad de la vacuna Rev 1, los animales vacunados se sometieron regularmente a examen clínico mediante palpación del contenido escrotal y a partir de los 9 meses de edad se les extrajo semen por electroeyaculación, con siembra

inmediata del mismo en el medio de Farrell.

Pasados 12 meses desde la vacunación, todos los animales fueron infectados experimentalmente por vía conjuntival y prepucial con un total de 10^9 UFC de B. ovis virulenta. Las alteraciones clínicas detectables por palpación genital se registraron periódicamente. Todos los animales fueron sacrificados a los 3 meses de la infección experimental.

Para estudios bacteriológicos, de cada animal se recogieron los siguientes órganos: hígado, bazo, riñones, testículos y epidídimos (separados quirúrgicamente), vesículas seminales, glándulas bulbouretrales, ampollas del conducto deferente, ganglios iliacos, crurales, prescapulares, submaxilares, parotídeos y retrofaríngeos. Todos estos órganos fueron suspendidos individualmente en Buffer Fosfato Potásico Salino estéril (0,019 M; 0,85 p. 100 de ClNa; pH 6,8). Los testículos y epidídimos se homogeneizaron en un triturador con vasos intercambiables y los demás órganos en un Estomacher. La siembra se realizó inmediatamente después de la trituración inoculando cantidades aproximadamente iguales de cada muestra en 2 placas del medio Thayer-Martin modificado y una de Agar- Sangre.

De cada animal se recogieron muestras de las ampollas del conducto deferente, vesículas seminales, glándulas bulbouretrales y del testículo y epidídimo para su estudio histopatológico. Dichas muestras se fijaron en Formol Salino tamponado al 10 p. 100 durante 24-48 horas y posteriormente se incluyeron en parafina. Los cortes de 5-6 micras de espesor fueron teñidos con hematoxilina-eosina y con el método tricrómico de Gallego por procedimientos estándar.

Para evaluar la respuesta humoral producida tras la vacunación e infección experimental, a cada animal se le tomó una muestra de sangre a los 7 y 15 días después de cada operación y posteriormente cada 15 días hasta la finalización de la experiencia. La respuesta humoral tras la vacunación fue determinada por las pruebas serológicas de RB y FC con antígenos lisos. Después de la infección experimental se utilizaron la pruebas de RB y FC con antígenos lisos y las pruebas de DDG y ELISA con antígenos de B. ovis.

3.5.2.2. Experiencia 2B. Inmunización de moruecos adultos.

Para esta experiencia se utilizaron 25 moruecos adultos de la misma edad y raza

(F₁ (Romanov x Aragonesa) x Fleischschaff), pertenecientes al rebaño libre de brucelosis del SIA-DGA y distribuidos en 3 lotes de la manera siguiente:

- 9 animales fueron vacunados subcutáneamente a los 13 meses de edad con 10⁹ Rev 1.
- 10 animales fueron vacunados conjuntamente a los 13 meses de edad con 10⁹ Rev 1.
- 6 animales se mantuvieron como controles no vacunados.

Para determinar la seguridad de la vacuna Rev 1, los animales vacunados se sometieron regularmente a palpaciones genitales y a controles bacteriológicos de semen.

Pasados 11 meses desde la vacunación, todos los animales recibieron 10⁹ UFC de B. ovis virulenta por vía conjuntival. Esta misma inoculación experimental se repitió 2 veces más con intervalos de 1 mes. Las alteraciones clínicas detectables por palpación fueron registrándose cada 7 días. Todos los animales fueron sacrificados a los 2 meses de la última infección experimental.

Los estudios bacteriológicos, histológicos y serológicos se llevaron a cabo de igual modo que en la Experiencia 2A anteriormente descrita.

3.5.3. Experiencia n^o 3. Determinación de la eficacia del tratamiento antibiótico de la infección por B. ovis.

Para esta experiencia se utilizaron 24 moruecos de la misma edad (18 meses) y raza (F₁ (Romanov x Aragonesa) x Fleischschaff), pertenecientes al rebaño libre de brucelosis del SIA-DGA. Estos animales fueron infectados experimentalmente por vía conjuntival y prepucial con 10⁹ B. ovis virulentas.

Cada 15 días se realizaron palpaciones genitales, exámen bacteriológico del semen y pruebas serológicas para determinar la respuesta humoral.

A los 4 meses de la infección experimental, cuando todos los animales estaban eliminando B. ovis por su semen, estos se distribuyeron al azar en 2 grupos de la siguiente manera:

- 12 animales fueron sometidos a un tratamiento con oxitetraciclina anfótera de acción prolongada (Terramicina LA, Pfizer) a razón de 20 mg/Kg de Peso Vivo, administrada cada 3 días (8 inoculaciones) por vía intramuscular.

- 12 animales fueron sometidos, al mismo tratamiento pero combinado con Sulfato de Dihidroestreptomicina (Estreptomicina, Antibióticos S.A.) a razón de 20 mg/Kg de Peso Vivo administrada todos los días (21 inoculaciones), por vía intramuscular.

Durante la aplicación de los tratamientos y finalizados estos, se realizaron cultivos de semen y tomas de sangre a intervalos semanales. A los 15 días de la finalización de los tratamientos todos los animales fueron sacrificados.

Los estudios bacteriológicos, histológicos y serológicos se llevaron a cabo de la misma manera que para las experiencias 2A y 2B.



4. RESULTADOS

4.1. Resultados de la experiencia n^o1

4.1.1. Resultados de la estandarización del ELISA con tres preparaciones antigénicas de B. ovis y tres sustratos diferentes.

Como ha sido descrito anteriormente (ver 3.3.4. Material y Métodos), la dilución óptima de suero a utilizar en cada ELISA fue aquella en la que las diferencias del valor medio de DO entre las dos poblaciones control positiva y negativa (representadas gráficamente en las FIGURAS 1, 2, 3 y 4), fueron mayores. Los resultados de la estandarización del ELISA se resumen en el CUADRO 1. Como puede apreciarse en dicho cuadro, las diluciones óptimas de suero variaban para cada antígeno y para cada sustrato. Las diluciones óptimas de conjugado también variaron según el sustrato utilizado.

4.1.2. Comparación del valor diagnóstico de las pruebas de Doble Difusión en Gel (DDG), Fijación del Complemento (FC) y ELISA.

4.1.2.1. Doble Difusión en Gel.

Los resultados diagnósticos

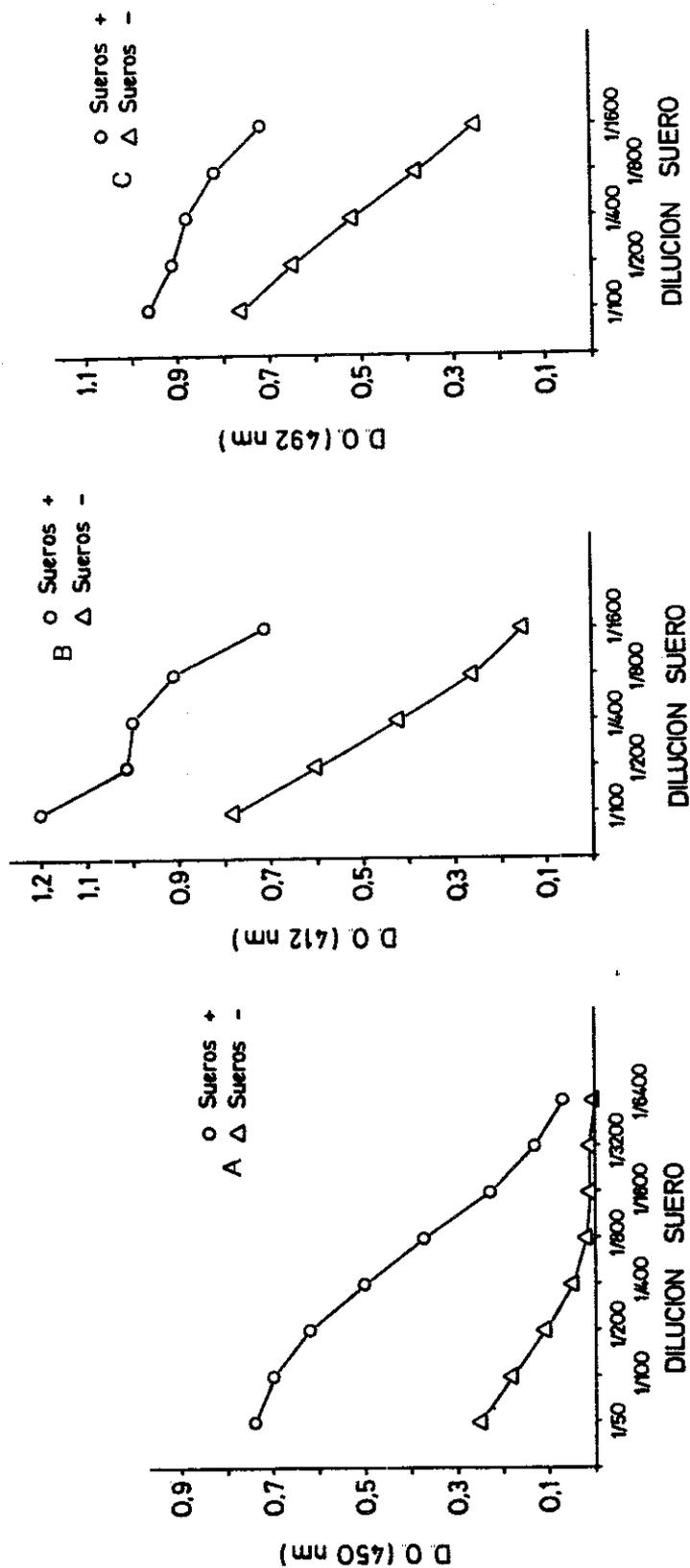


FIGURA 1. Determinación de la dilución óptima de suero en el test ELISA con antígeno HS y los sustratos 5-AS (Fig. A), ABTS (Fig. B) y OPD (Fig. C).

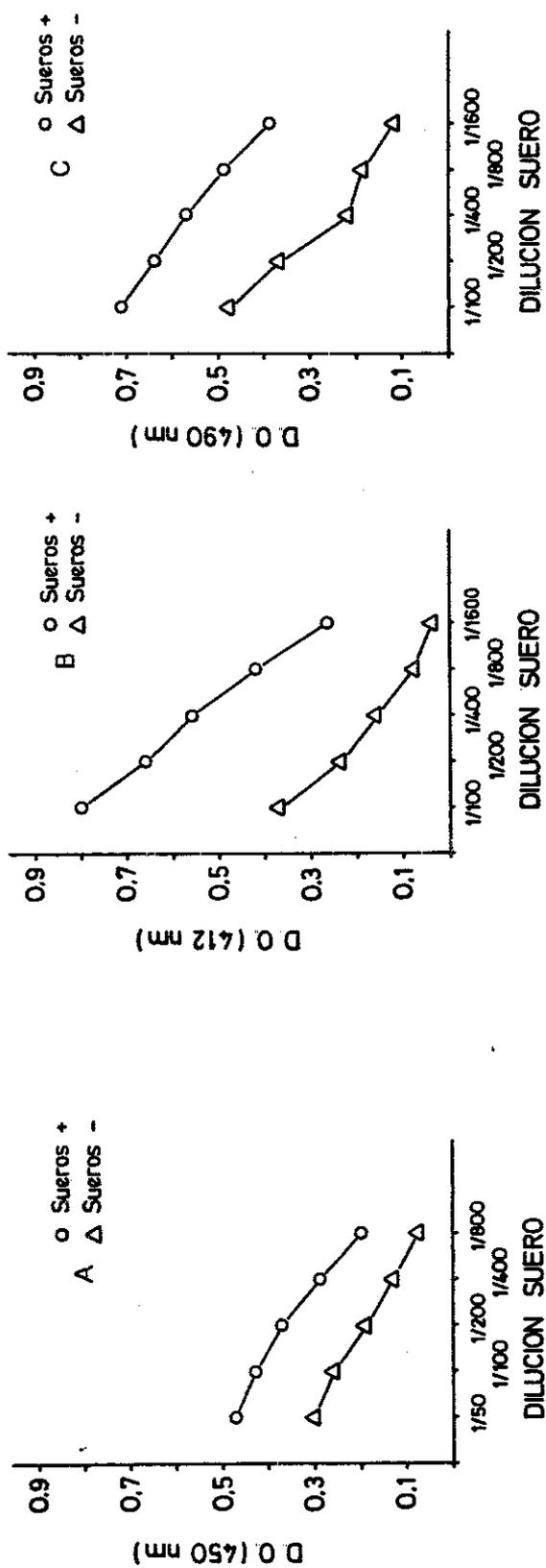


FIGURA 2. Determinación de la dilución óptima de suero en el test ELISA con antígeno RG y los sustratos 5-AS (Fig. A), ABTS (Fig. B) y OPD (Fig. C).

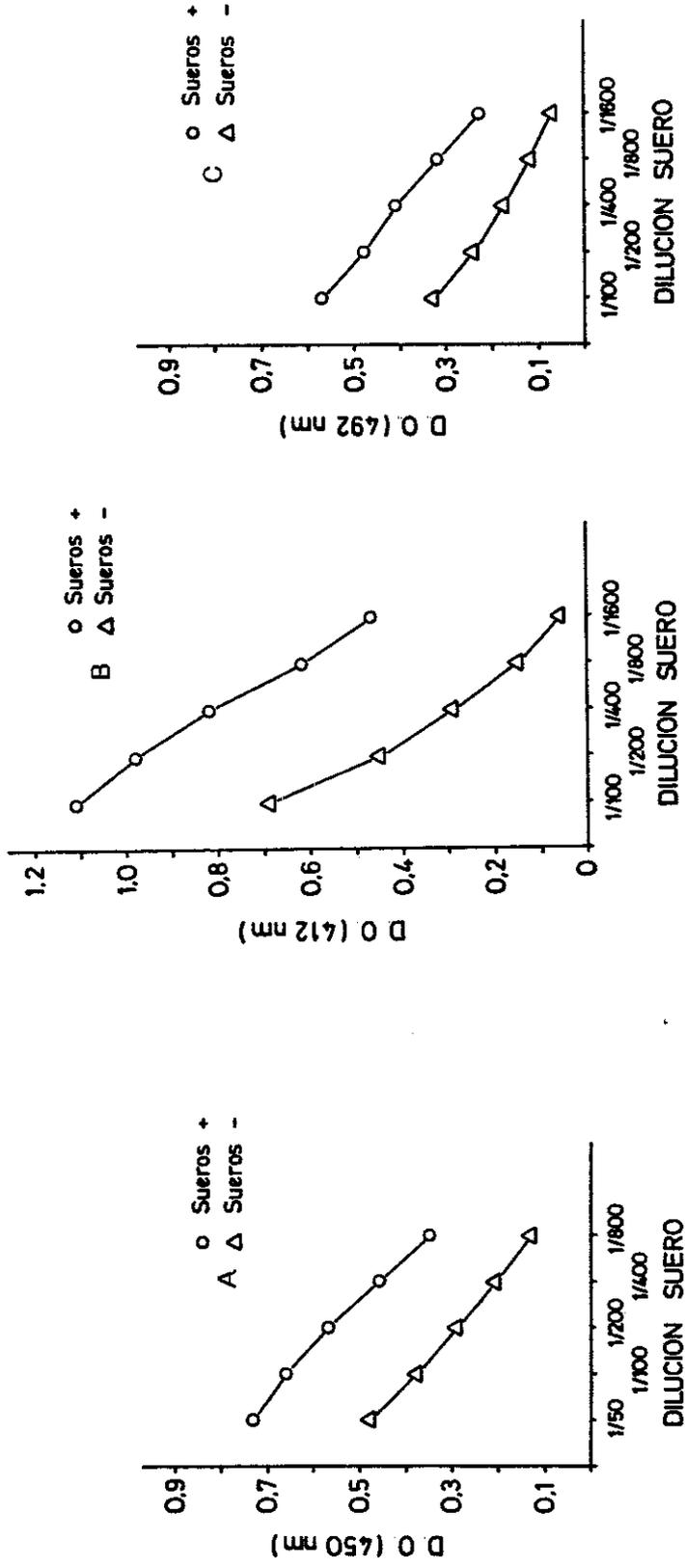


FIGURA 3. Determinación de la dilución óptima de suero en el test ELISA con antígeno SP y los sustratos 5-AS (Fig. A), ABTS (Fig. B) y OPD (Fig. C).

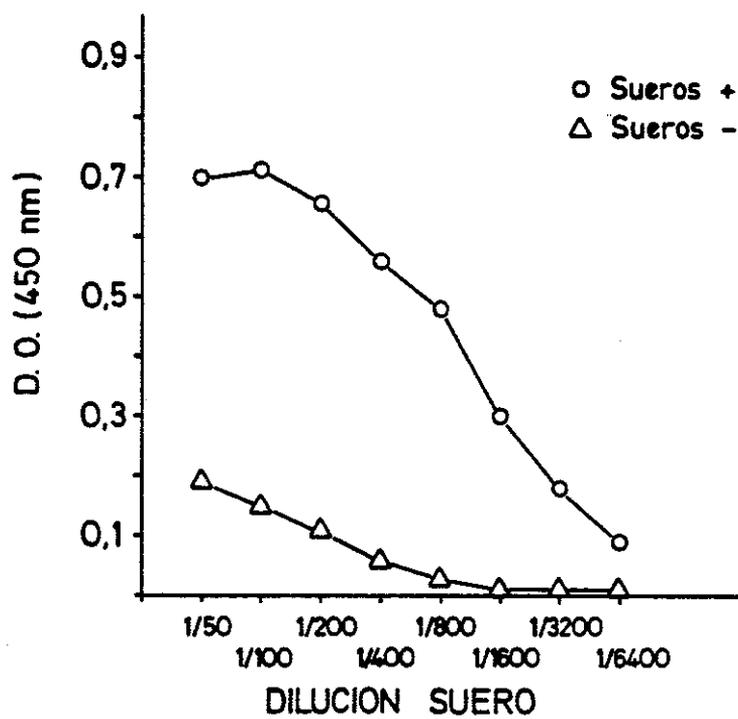
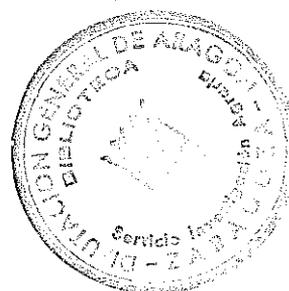


FIGURA 4. Determinación de la dilución óptima de suero en el test ELISA con antígeno HS-V y 5-AS como sustrato.

CUADRO 1. Diluciones óptimas de suero y conjugado para la realización de la prueba ELISA con los antígenos HS, RG y SP y los sustratos 5-AS, ABTS y OPD.

Sustrato	Dilución de suero en función del antígeno usado			Dilución del Conjugado
	HS	RG	SP	
5-AS	1/100	1/200	1/400	1/3.500
ABTS	1/800	1/400	1/800	1/5.000
OPD	1/1.600	1/400	1/400	1/5.000



obtenidos con esta prueba serológica se presentan en el CUADRO 2.

Con el antígeno HS sólo resultaron negativos 3 de los 83 animales con cultivo positivo (sensibilidad 96,38 p.100), mientras que todos los sueros de animales libres de infección dieron resultado negativo (especificidad 100 p.100). Cuando se utilizó el antígeno obtenido de B. ovis virulenta (antígeno HS-V), se obtuvo una sensibilidad 84,34 p.100 con una especificidad del 100 p.100.

A pesar del tratamiento con trietilamina o por ultrasonidos, el antígeno RG no dio resultados satisfactorios. Cuando se solubilizó con seroalbúmina bovina (BSA), se observaron reacciones de precipitación con sueros de algunos animales pero su nivel de sensibilidad fue muy bajo (menos del 20 p.100).

Con el antígeno SP tan solo fueron detectados 45 de los 83 sueros positivos (sensibilidad 54,23 p.100) con un 100 p.100 de especificidad.

4.1.2.2. Fijación del Complemento.

Los resultados diagnósticos obtenidos con esta prueba serológica se expresan en el

CUADRO 2. Resultados serológicos en la prueba de DDG con los antígenos HS-V, HS, RG y SP, utilizando 83 sueros controles positivos y 83 negativos.

Antígeno	Sensibilidad ¹		Especificidad ²	
HS-V	70/83	(84,34)	83/83	(100)
HS	80/83	(96,38)	83/83	(100)
RG	ND		ND	
SP	45/83	(54,23)	83/83	(100)

1 = Relación N^o animales positivos/N^o infectados.

2 = Relación N^o animales negativos/N^o libres infección.

ND = No determinado.

() = Porcentajes.

CUADRO 3.

Con el antígeno HS se detectaron 77 de los 83 animales positivos (sensibilidad 92,77 p.100), no encontrándose diferencias significativas de sensibilidad entre los antígenos HS y HS-V. La especificidad de ambos antígenos fue del 100 p.100.

El antígeno RG detectó 59 de los 83 sueros control positivo (sensibilidad 71,1 p.100) con una especificidad del 100 p.100.

El antígeno SP se utilizó en concentraciones variables desde 1 ug/ml hasta 10 mg/ml, no lográndose reacción positiva alguna con los sueros control positivo utilizados.

4.1.2.3. ELISA.

Como ha sido citado anteriormente (ver 3.3.4., Material y Métodos), la sensibilidad y especificidad de este test se calculó en función del grado de solapamiento de los histogramas de frecuencias de los valores individuales de DO para la dilución óptima de suero (ver 4.1.1.) en las dos poblaciones control. Los resultados se representan en las FIGURAS 5, 6, 7 y 8 y se esquematizan en el CUADRO 4. Como puede observarse en dicho cuadro, con el

CUADRO 3. Resultados serológicos en la prueba de FC con los antígenos HS-V, HS, RG y SP, utilizando 83 sueros controles positivos y 83 negativos.

Antígeno	Sensibilidad ¹		Especificidad ²	
HS-V	76/83	(91,57)	83/83	(100)
HS	77/83	(92,77)	83/83	(100)
RG	59/83	(71,10)	83/83	(100)
SP	ND		ND	

1 = Relación N^o animales positivos/N^o infectados.

2 = Relación N^o animales negativos/N^o libres infección.

ND = No determinado.

() = Porcentajes.

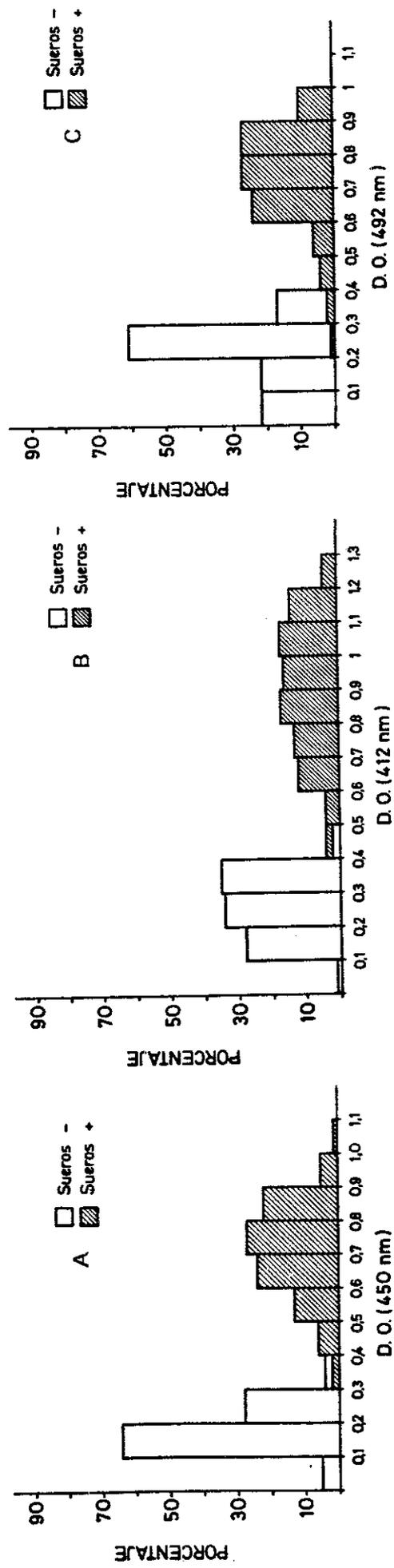


FIGURA 5. Distribución de las densidades ópticas de la dilución óptima de los sueros positivos y negativos en el test ELISA con el antígeno HS y los sustratos 5-AS (Fig. A), ABTS (Fig. B) y OPD (Fig. C).

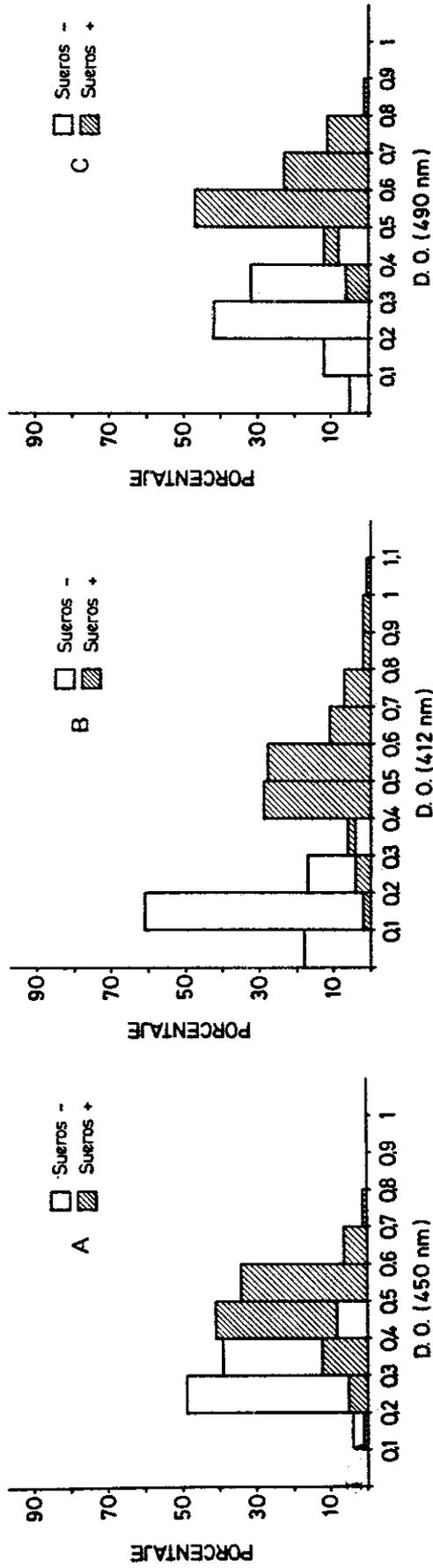


FIGURA 6. Distribución de las densidades ópticas de la dilución óptima de los sueros positivos y negativos en el test ELISA con el antígeno RG y los sustratos 5-AS (Fig. A), ABTS (Fig. B) y OPD (Fig. C).

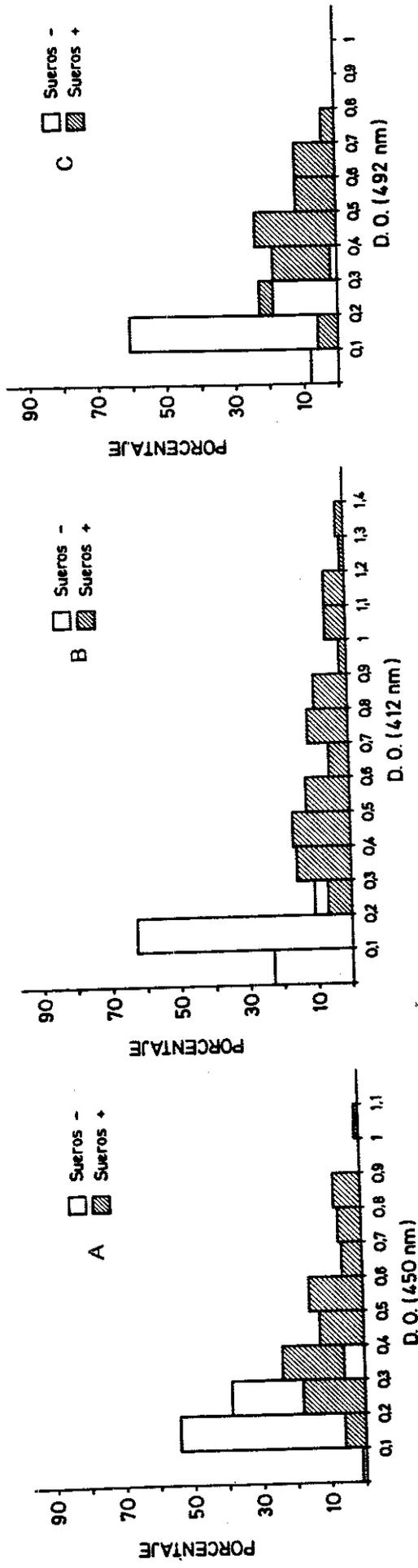


FIGURA 7. Distribución de las densidades ópticas de la dilución óptima de los sueros positivos y negativos en el test ELISA con el antígeno SP y los sustratos 5-AS (Fig. A), ABTS (Fig. B) y OPD (Fig. C).

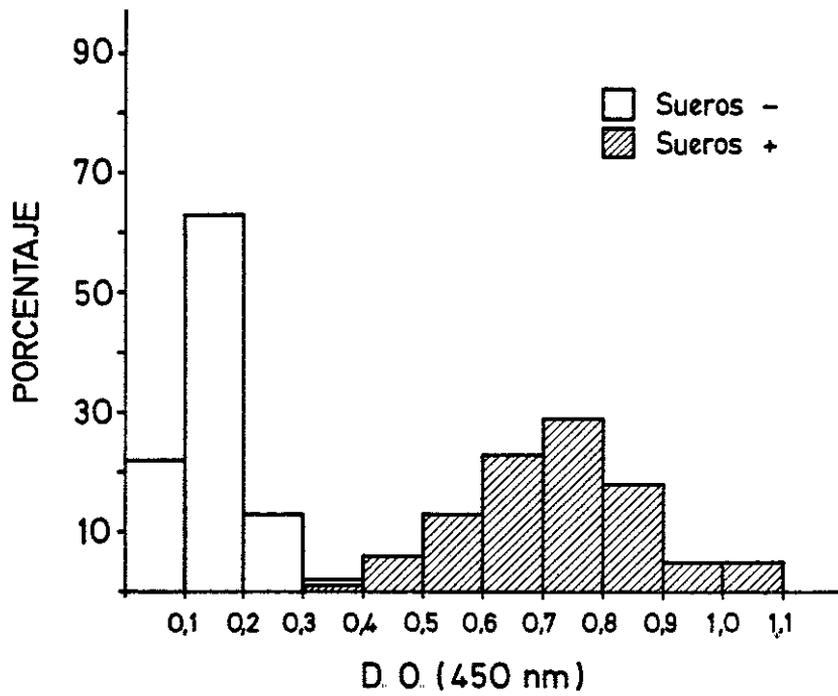


FIGURA 8. Distribución de las densidades ópticas de la dilución 1/100 de los sueros negativos y positivos en el test ELISA con antígeno HS-V y el sustrato 5-AS.

CUADRO 4. Resultados serológicos en la prueba de ELISA con los diferentes sustratos y antígenos utilizando 83 sueros controles positivos y 83 negativos.

Sustrato	Antígeno	Sensibilidad ¹		Especificidad ²	
5-AS	HS-V	82/83	(98,79)	83/83	(100)
	HS	81/83	(97,59)	83/83	(100)
	RG	63/83	(75,90)	83/83	(95,18)
	SP	43/83	(51,81)	83/83	(100)
ABTS	HS-V		ND		ND
	HS	81/83	(97,59)	83/83	(100)
	RG	73/83	(87,95)	83/83	(100)
	SP	49/83	(59,04)	83/83	(100)
OPD	HS-V		ND		ND
	HS	80/83	(96,39)	83/83	(100)
	RG	68/83	(81,93)	83/83	(100)
	SP	43/83	(51,81)	83/83	(100)

1 = Relación N^o animales positivos/N^o infectados.

2 = Relación N^o animales negativos/N^o libres infección.

ND = No determinado.

() = Porcentajes.

sustrato 5-AS, el antígeno HS-V (FIGURA 8) es el que mayor número de animales cultivo positivo detectó. La sensibilidad con este antígeno no fue significativamente distinta de la obtenida con el antígeno HS (FIGURA 5) extraído de la cepa REO 198 de B. ovis (98,79 vs 97,59 p.100, respectivamente). Por esta razón, el antígeno HS-V no se testó con los demás sustratos. Los mejores resultados diagnósticos individuales se obtuvieron con el antígeno HS y los sustratos 5-AS y ABTS (97,59 p. 100 de sensibilidad con un 100 p. 100 de especificidad).

El antígeno RG (FIGURA 6) siempre presentó una sensibilidad menor que la del HS. Los mejores resultados diagnósticos obtenidos con este antígeno lo fueron con el sustrato ABTS (87,95 p. 100 de sensibilidad con un 100 p. 100 de especificidad).

La sensibilidad que se obtuvo con el antígeno SP (FIGURA 7) varió con los distintos sustratos entre un 51,81 p.100 y un 59,04 p.100, con una especificidad del 100 p.100

Aunque las diferencias entre los valores de especificidad y sensibilidad obtenidos con los diferentes sustratos no fueron estadísticamente significativas, las poblaciones positivas y negativas aparecieron mas claramente diferenciadas con el sustrato

ABTS (FIGURAS 5, 6 y 7). Debido a esta mejor resolución, el sustrato ABTS fue el empleado para medir la respuesta inmune humoral en las experiencias posteriores.

4.1.3. Resultados comparativos de las técnicas DDG, FC y ELISA con los antígenos de B. ovis.

En el CUADRO 5 se expresan los resultados serológicos de las tres pruebas con el antígeno HS obtenido de la cepa 198 REO. Ninguno de los 83 sueros control negativo fue detectado como positivo en ELISA, DDG o FC (especificidad del 100 p.100). Desde el punto de vista individual, el ELISA dio los mejores resultados diagnósticos (97,59 p. 100 de sensibilidad), mientras que la FC presentó los peores (92,77 p. 100 de sensibilidad), aunque estas diferencias no son muy significativas desde el punto de vista estadístico. La prueba de FC no mejoró la sensibilidad individual de la DDG ni la del ELISA cuando se utilizó para el diagnóstico conjunto de la infección por B. ovis. Sin embargo, la asociación de la prueba de DDG y del ELISA proporcionó la máxima sensibilidad (100 p. 100).

4.2. Resultados de la experiencia n^o2A: Comparación de las vías de inoculación subcutánea y conjuntival de la vacuna Rev 1 para la profilaxis de moruecos jóvenes.



CUADRO 5. Resultados serológicos comparativos de las técnicas ELISA (ABTS), DDG y FC con el antígeno HS y los 83 sueros controles positivos y negativos.

	N ^o de Sueros positivos en						
	Total de Sueros	ELISA	DDG	FC	ELISA + DDG	ELISA + FC	DDG + FC
Control Positivo	83	81	80	77	83	81	80
Control Negativo	83	--	--	--	--	--	--

4.2.1. Seguridad de la vacuna.

La vacuna no produjo alteraciones testiculares detectables por palpación en ninguno de los animales vacunados. Además, los cultivos de semen realizados para el aislamiento de la cepa vacunal, dieron resultado negativo. La cepa Rev 1 tampoco fue aislada de ningún animal tras la necropsia de los mismos.

4.2.2. Evolución de la respuesta humoral tras la vacunación frente a antígenos de la fase lisa de Brucella.

La evolución de la respuesta humoral en los animales vacunados, medida por RB y FC, esta representada en la FIGURA 9. Como puede apreciarse, la respuesta humoral en los animales vacunados conjuntivamente fue más tardía, de menor intensidad y de menor duración que la de los vacunados subcutáneamente. A la semana de la vacunación todos los moruecos vacunados subcutáneamente reaccionaron en FC con un título medio máximo (diluciones de suero hasta 1/256), mientras que los moruecos vacunados por vía conjuntival eran todavía negativos. La máxima respuesta humoral (mayor porcentaje de reaccionantes y mayor título medio) tras la vacunación conjuntival se produjo a las 4 semanas de la misma. A los 4 meses de la vacunación, todos los animales vacunados

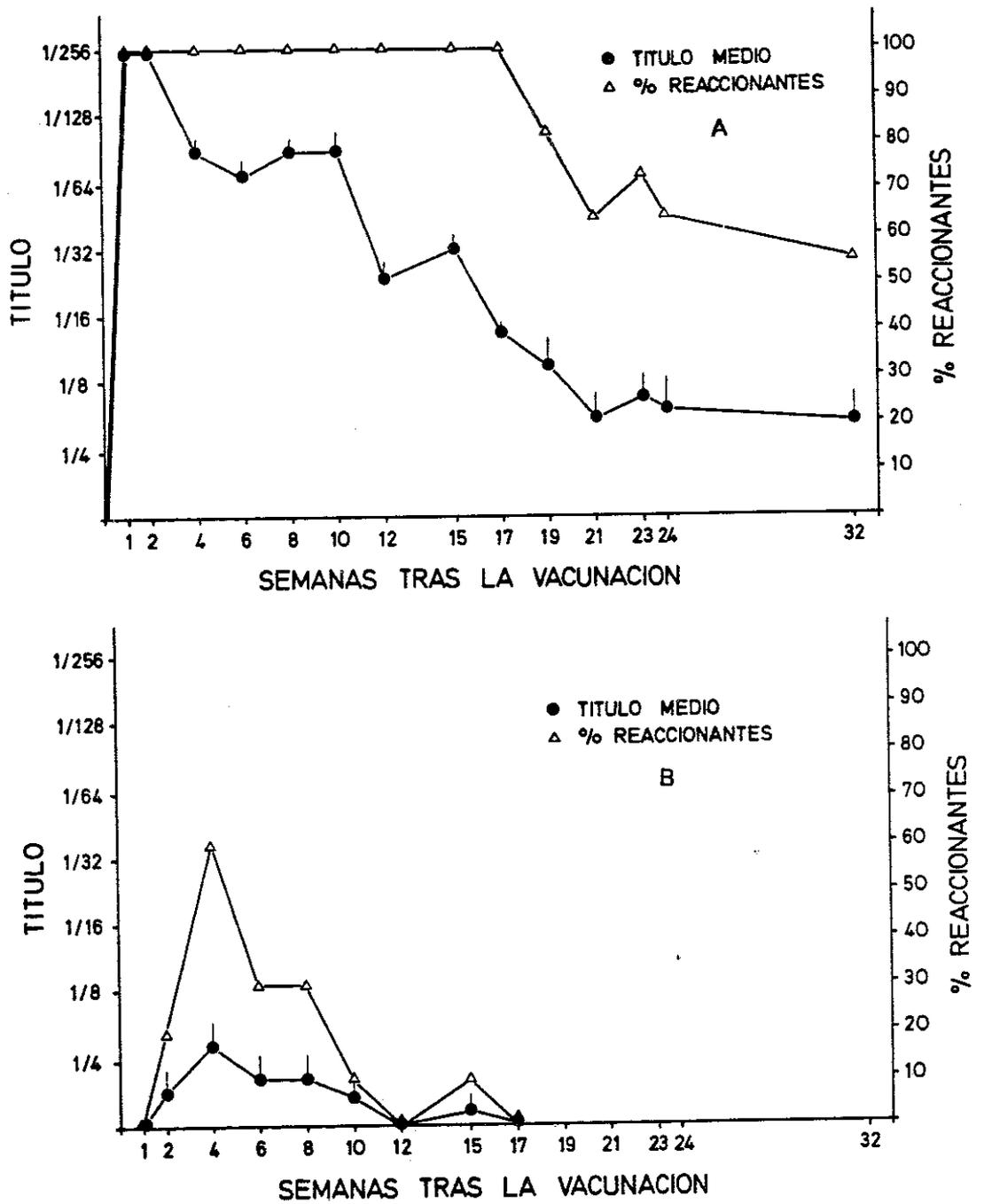


FIGURA 9. Evolución de la respuesta humoral en Fijación de Complemento de moruecos vacunados a los seis meses de edad con Rev 1 por vía subcutánea (Fig. A) o por vía conjuntival (Fig. B).

conjuntivamente eran serológicamente negativos, mientras que la totalidad de los animales vacunados subcutáneamente daban resultado serológico positivo. Ocho meses después de la vacunación, un 55 p.100 de los animales vacunados por vía subcutánea daba todavía serología positiva frente a los antígenos de la fase lisa de Brucella.

4.2.3. Evolución de la respuesta humoral frente a antígenos de la fase rugosa, tras la infección experimental con B. ovis.

La evolución del porcentaje de animales de los tres lotes que reaccionaron positivamente en DDG y ELISA con antígeno HS tras la infección experimental está representada en la FIGURA 10. Como puede observarse, en los moruecos vacunados conjuntivamente hubo una respuesta humoral menos intensa que en el resto. En conjunto, el porcentaje de animales que reaccionó frente al antígeno HS en DDG fue menor en los animales vacunados que en los animales testigos no vacunados. La evolución de los títulos medios en el ELISA fue muy similar en los animales testigo y en los vacunados por vía subcutánea. Los animales vacunados por vía conjuntival presentaron unos títulos medios inferiores a los de los otros lotes.

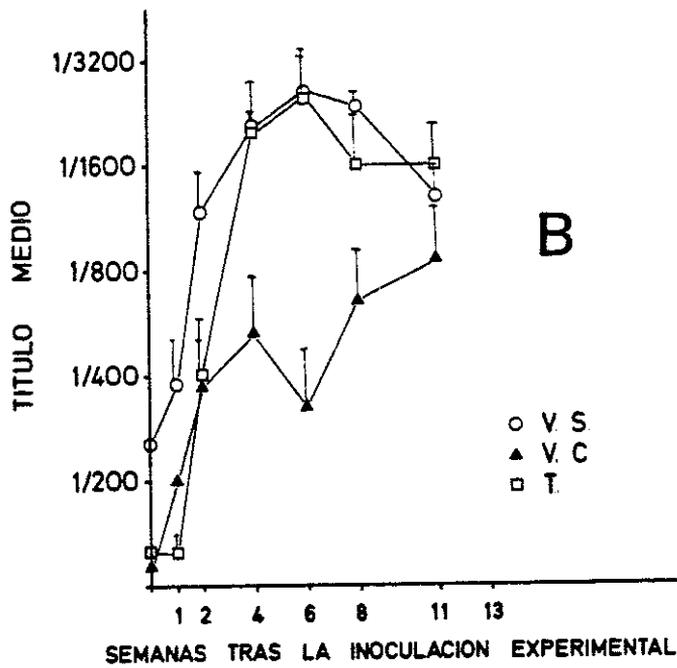
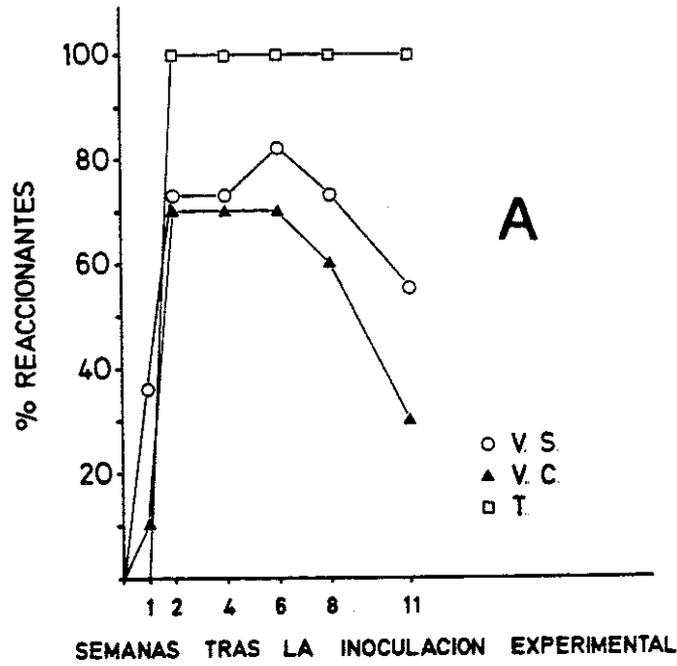


FIGURA 10. Evolución de la respuesta humoral en DDG (Fig. A) y ELISA (Fig. B) con antígeno HS tras la infección experimental con *B. ovis* de moruecos jóvenes vacunados con Rev 1 (V.S. = Vacunados subcutáneamente; V.C. = Vacunados conjuntivalmente; T = Testigos no vacunados).

4.2.4. Resultados clínicos, bacteriológicos y anatomopatológicos tras la infección experimental.

Tan sólo un animal de los utilizados como controles no vacunados presentó epididimitis en el momento del sacrificio. Las primeras alteraciones clínicas, demostrables mediante palpación, se observaron a las 8 semanas de la infección experimental en este animal. El mayor número de alteraciones testiculares se detectó en el examen clínico realizado la semana 11 tras la inoculación experimental, apreciándose lesiones de epididimitis en 3 animales del lote testigo no vacunado. En las semanas siguientes, estas lesiones dejaron de apreciarse por palpación en 2 animales, no volviendo a aparecer posteriormente. En la necropsia sólo era apreciable la epididimitis en el animal afectado clínicamente.

Ninguno de los animales vacunados mostró alteraciones clínicas por palpación genital. Sin embargo, tras la necropsia se apreciaron lesiones de epididimitis en 2 moruecos vacunados conjuntamente.

Los resultados del examen clínico y del estudio bacteriológico tras la necropsia, están expresados en el CUADRO 6. La infección se puso en evidencia en el 100 p. 100 de los animales testigos no

CUADRO 6. Alteraciones testiculares, infección bacteriológica y grado de la misma en los animales jóvenes vacunados subcutánea o conjuntivalmente con Rev 1 y sometidos a infección experimental con B. ovis. (Experiencia 2A. Ver 3.5.2.1. de Material y Métodos).

Grupo	Nº Animales		Muestras sembradas			
	Alt. Clínicas	Infectados	DIF. (1)	Nº	Nº Positivas	DIF. (1)
V.S.	11	--	--	143	--	
V.C.	10	2 (20)	3 (30)	130	3 (2,31)	N.S.
TOTAL	21	2 (9,52)	3 (14,29)	273	3 (1,15)	
Testigos	6	1 (16,66)	6 (100)	78	40 (51,28)	***

V.S.= Vacunados subcutáneamente.

V.C.= Vacunados conjuntivalmente.

T= Testigos no vacunados.

()= Porcentajes.

(1) χ^2 Pearson *** p < 0,001; * p < 0,05; N.S.= Diferencias no significativas.

vacunados, mientras que B. ovis se aisló tan sólo de tres moruecos, pertenecientes al lote vacunado conjuntamente. Estos resultados indican que los 11 moruecos vacunados subcutáneamente (100 p. 100) y 7 de los moruecos vacunados conjuntamente (70 p.100) quedaron protegidos frente a una dosis de B. ovis capaz de infectar al 100 p. 100 de los animales testigos no vacunados. En conjunto, el 85,71 p. 100 de los animales vacunados quedó protegido frente a la infección. Además, el porcentaje de muestras sembradas que resultaron positivas fue significativamente mayor ($p < 0,001$) en el lote de animales testigos no vacunados (51,28 p. 100) que en los vacunados conjuntamente que llegaron a infectarse (2,31 p. 100).

En el CUADRO 7 se presenta la distribución de la infección en aquellos animales de los que se aisló B. ovis tras la infección experimental. En los animales testigos no vacunados, los órganos de localización preferente de la bacteria fueron las vesículas seminales, las ampollas de conducto deferente y los epidídimos. En estos animales B. ovis se aisló siempre de algún órgano que interviene en la elaboración de los componentes del semen. Sin embargo, en un animal vacunado conjuntamente sólo se aisló de los ganglios de la cabeza. Además de que la infección estaba menos diseminada en los animales vacunados de los que se aisló

CUADRO 7. Distribución de B. ovis en los órganos de los moruecos que resultaron infectados tras la inoculación experimental en los animales jóvenes vacunados con Rev 1. (Experiencia 2A. Ver 3.5.2.1. de Material y Métodos)

Grupos	N ^o Aislamientos		
	V.S.	V.C.	T
N ^o de moruecos infectados	-	3	6
Organos			
Hígado	-	-	1
Bazo	-	-	3
Testículo derecho	-	-	4
Epidídimo derecho	-	-	4
Testículo izquierdo	-	-	2
Epidídimo izquierdo	-	2	4
Vesículas seminales	-	-	6
Glándulas bulbouretrales	-	-	3
Ampollas del conducto deferente	-	-	5
Ganglios iliacos	-	-	2
Ganglios crurales	-	-	2
Ganglios escapulares	-	-	1
Ganglios de la cabeza ^(*)	-	1	2

V.S.= Vacunados subcutáneamente.

V.C.= Vacunados conjuntivalmente.

T= Testigos no vacunados.

(*) submaxilares + parotideos + retrofaringeos

B. ovis, el número de colonias que creció en las muestras positivas de estos animales, fue siempre mucho menor que en el caso de los animales testigos.

Las lesiones microscópicas se expresan de forma esquemática en el CUADRO 8. Cuando existieron, las lesiones se clasificaron en graves o leves. Las lesiones clasificadas como graves fueron edema, fibrosis, hiperplasia epitelial e infiltración difusa de células plasmáticas y linfocitos. Las lesiones leves incluyeron vacuolización de las porciones basales del epitelio y discretas hiperplasia epitelial y fibrosis. Todos los animales del lote testigo presentaron lesiones en el testículo, dos de ellos de carácter grave (FIGURA 11). Los animales vacunados también mostraron lesiones testiculares pero de menor intensidad que las de los moruecos testigos no vacunados.

Las lesiones más graves en las glándulas bulbouretrales fueron observadas en dos animales vacunados (FIGURA 12). Los moruecos no vacunados no presentaron lesiones graves en este órgano. En las vesículas seminales, las lesiones más importantes (FIGURA 13) se apreciaron en los moruecos testigos no vacunados. Dos de los moruecos testigos y dos de los vacunados conjuntamente presentaron lesiones graves en el epidídimo (FIGURA 14). En este órgano, los

CUADRO 8. Grado de las lesiones microscópicas observadas tras la infección experimental en los animales jóvenes vacunados subcutánea o conjuntivalmente con Rev 1. (Experiencia 2A. Ver 3.5.2.1. de Material y Métodos).

	Intensidad	Nº Moruecos		
		V.S.	V.C.	T
Testículos	Grave	1	1	2
	Leve	7	8	4
	Inexistente	3	1	-
Glándulas Bulbouretrales	Grave	1	1	-
	Leve	3	5	3
	Inexistente	7	4	3
Vesículas Seminales	Grave	-	-	1
	Leve	6	4	3
	Inexistente	5	6	2
Epidídimos	Grave	-	2	2
	Leve	4	4	-
	Inexistente	7	4	4
Ampollas	Grave	-	-	4
	Leve	6	2	1
	Inexistente	5	8	1

V.S.= Vacunados subcutáneamente.

V.C.= Vacunados conjuntivalmente.

T= Testigos no vacunados.

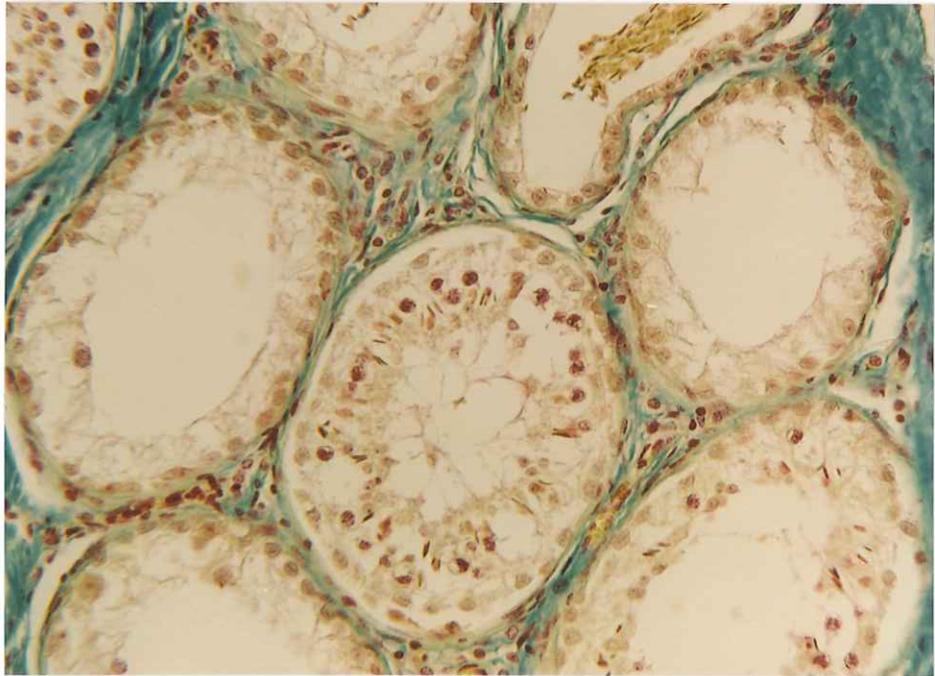


FIGURA 11. Lesiones microscópicas en testículo. A: Necrosis y calcificación de túbulos seminíferos e intensa esclerosis. Método de Gallego. 100 x. B: Desprendimiento del epitelio germinal y esclerosis. Método de Gallego. 250 x.

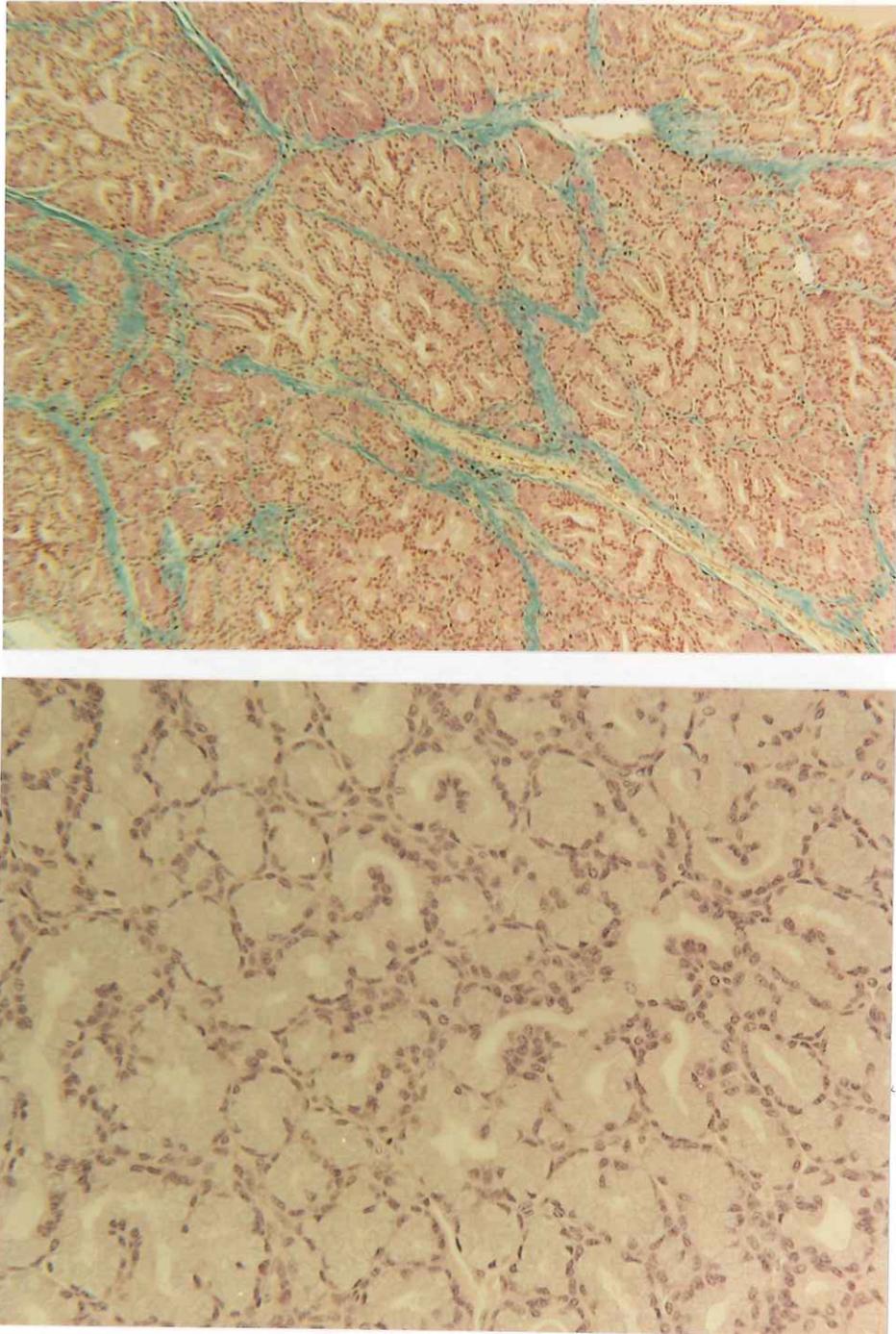


FIGURA 12. Lesiones microscópicas en glándula bulbouretral. A: Hiperplasia epitelial, intensa esclerosis y presencia de algunos linfocitos en tejido intersticial. Metodo de Gallego. 100 x. B: Crecimientos papilares en algunos adenómeros y presencia de células plásmaticas en tejido intersticial. H.E. 250 x.

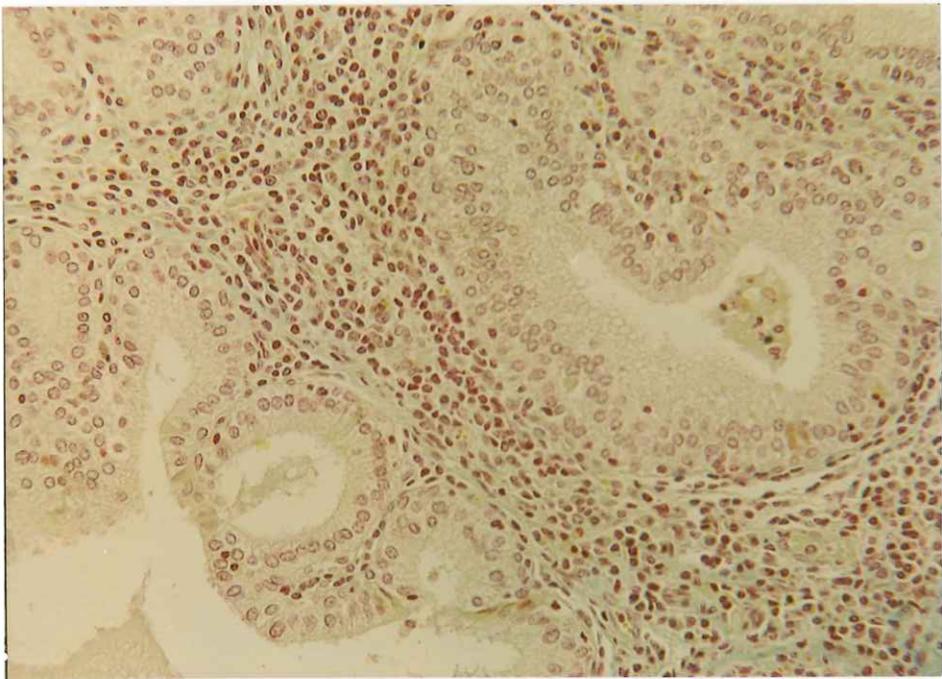
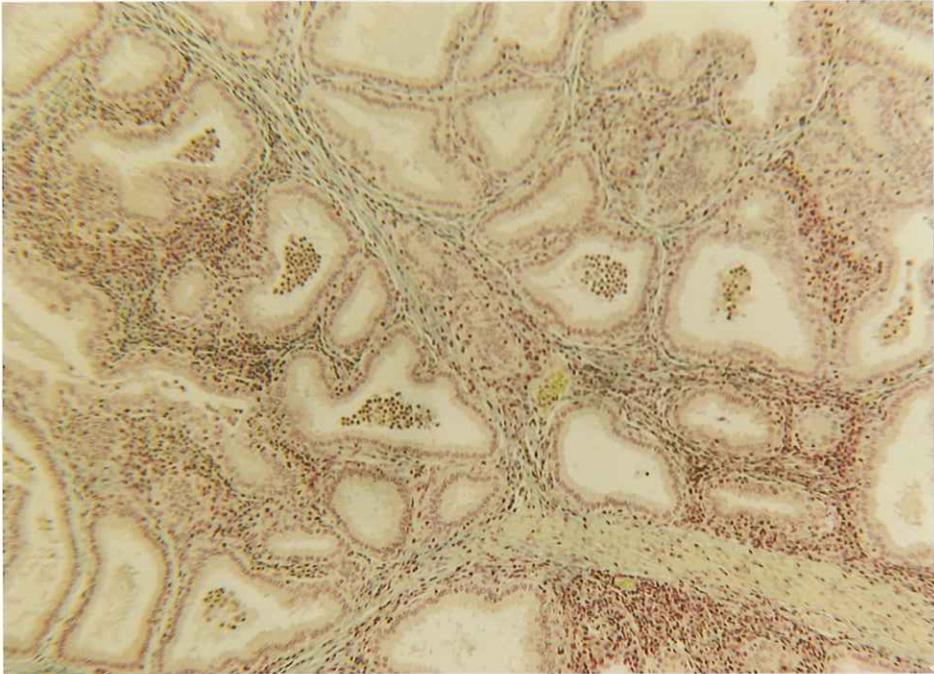


FIGURA 13. Lesiones microscópicas en vesícula seminal. A: Hiperplasia epitelial con formación de quistes intraepiteliales y presencia de acúmulos de neutrófilos en la luz de los adenómeros. Esclerosis y extensos infiltrados de células redondas en tejido intersticial. Método de Gallego. 100 x. B: Presencia de quistes intraepiteliales en adenómeros y amplios infiltrados de células plasmáticas en la lamina propia. Método de Gallego. 250 x.

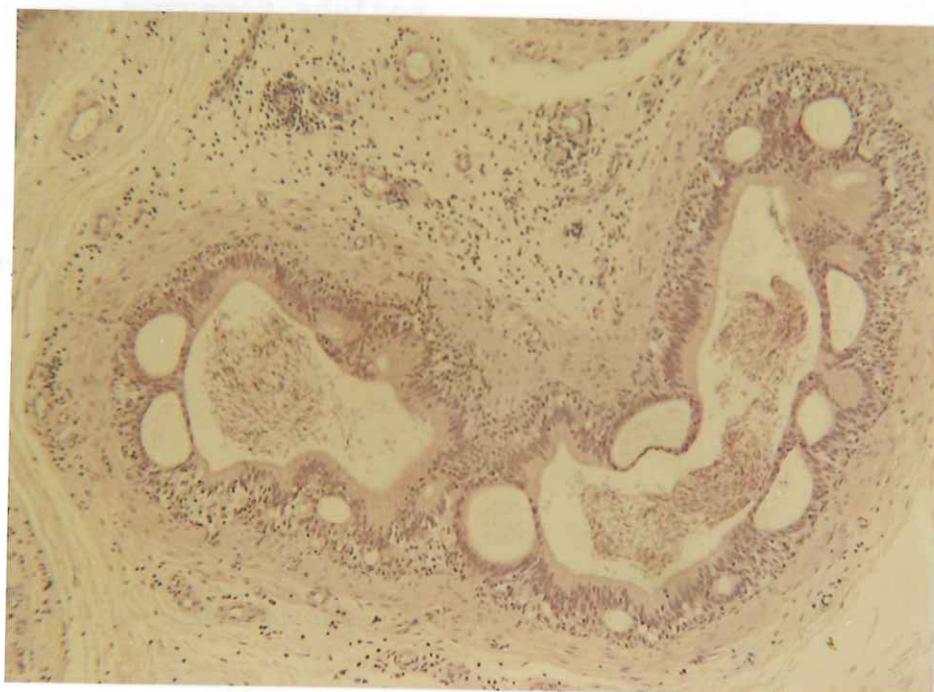
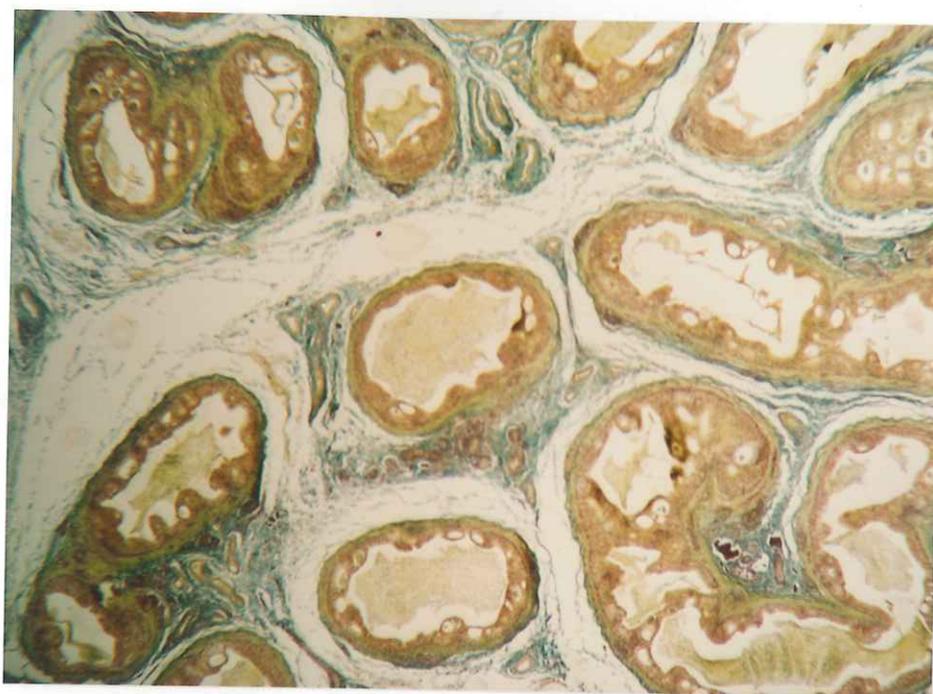


FIGURA 14. Lesiones microscópicas en epidídimo. A: Hiperplasia epitelial con formación de quistes intraepiteliales vacíos o llenos de células. Edema, proliferación de tejido conectivo e infiltrados de células redondas intraepiteliales y perivasculares. Método de Gallego. 28 x. B: Detalle de las lesiones descritas en A. H.E. 100 x.

animales vacunados por vía conjuntival presentaron lesiones de mayor intensidad que los moruecos vacunados por vía subcutánea. Mientras que cuatro animales testigos no vacunados presentaban lesiones de carácter grave en las ampollas del conducto deferente (FIGURA 15), los animales vacunados no presentaron lesiones graves en este órgano.

4.3. Resultados de la experiencia 2B: Comparación de las vías de inoculación subcutánea y conjuntival de la vacuna Rev 1 para la inmunización de moruecos adultos.

4.3.1. Seguridad de la vacuna.

Al igual que en la experiencia anterior no se apreciaron alteraciones testiculares debidas a la vacuna. Además, los cultivos de semen realizados para el aislamiento de la cepa vacunal dieron resultado negativo y, tras la necropsia, la cepa Rev 1 tampoco fue aislada de ningún animal.

4.3.2. Evolución de la respuesta humoral tras la vacunación frente a los antígenos de la fase lisa.

La evolución de la respuesta humoral en los animales vacunados, medida por RB y FC, esta expresada en la FIGURA 16. Al igual que en la experiencia anterior, la respuesta humoral en los

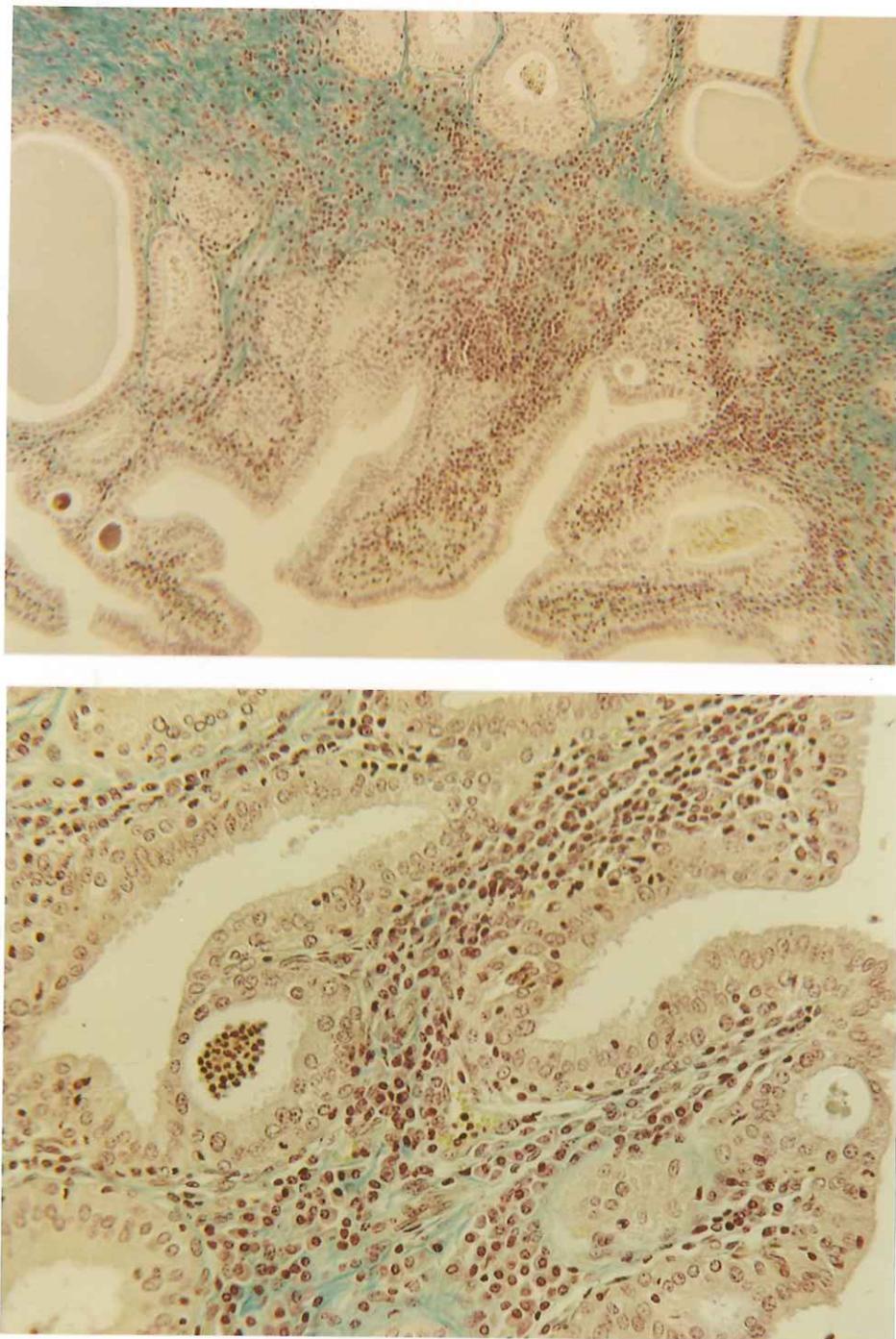


FIGURA 15. Lesiones microscópicas en ampolla del conducto deferente. A: Intensa esclerosis y amplios infiltrados de células redondas en tejido intersticial. Método de Gallego. 100 x. B: Hiperplasia epitelial con formación de quistes intraepiteliales vacíos o llenos de neutrófilos y extensos infiltrados de células plasmáticas y linfocitos en tejido intersticial. Método de Gallego. 250 x.

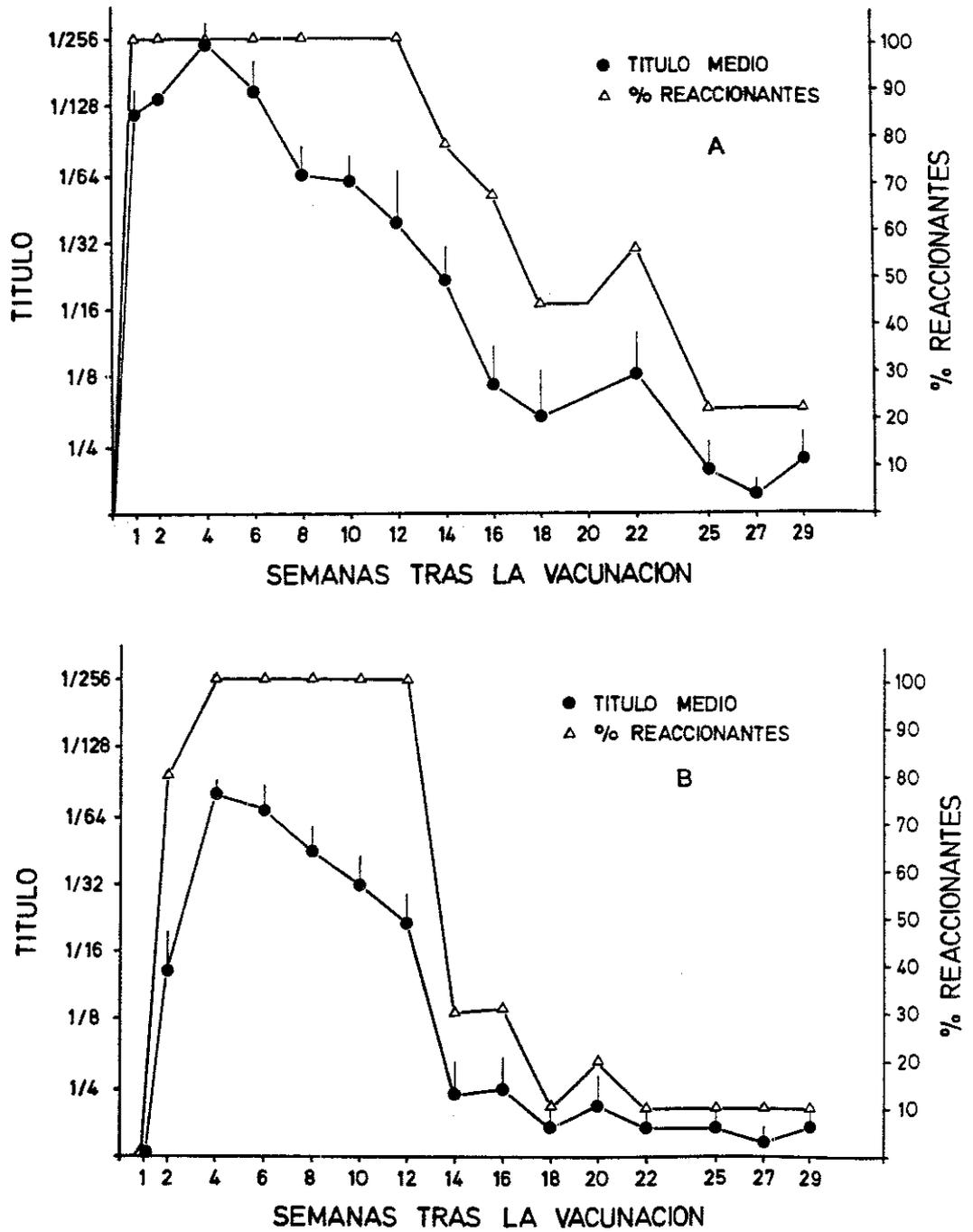


FIGURA 16. Evolución de la respuesta humoral en Fijación de Complemento de moruecos adultos vacunados con Rev 1 por vía subcutánea (Fig. A) o por vía conjuntival (Fig. B).

animales vacunados conjuntivamente fue más tardía y de menor intensidad que la de los vacunados subcutáneamente. Una semana tras la vacunación subcutánea todos los animales reaccionaban en FC, mientras que los vacunados conjuntivamente lo hicieron tres semanas más tarde. Independientemente de la vía de administración de la vacuna, la máxima respuesta humoral (medida por el título medio en FC y por el porcentaje de animales reaccionantes) se produjo en el primer mes tras la vacunación. La disminución de esta respuesta se produjo más rápidamente en los moruecos vacunados conjuntivamente que en los vacunados por vía subcutánea. A pesar de ello, en el momento de la inoculación experimental (11 meses después de la vacunación), había 2 moruecos (22,22 p.100) vacunados subcutáneamente y 1 morueco (10 p.100) vacunado conjuntivamente con un título en FC de 1/8.

4.3.3. Evolución de la respuesta humoral en DDG frente a antígenos de la fase rugosa tras la infección experimental con B. ovis.

La evolución del porcentaje de animales de los 3 lotes que reaccionaron positivamente en DDG con el antígeno HS tras las 3 inoculaciones experimentales consecutivas, esta expresada en la FIGURA 17. A partir de la tercera semana tras la primera inoculación

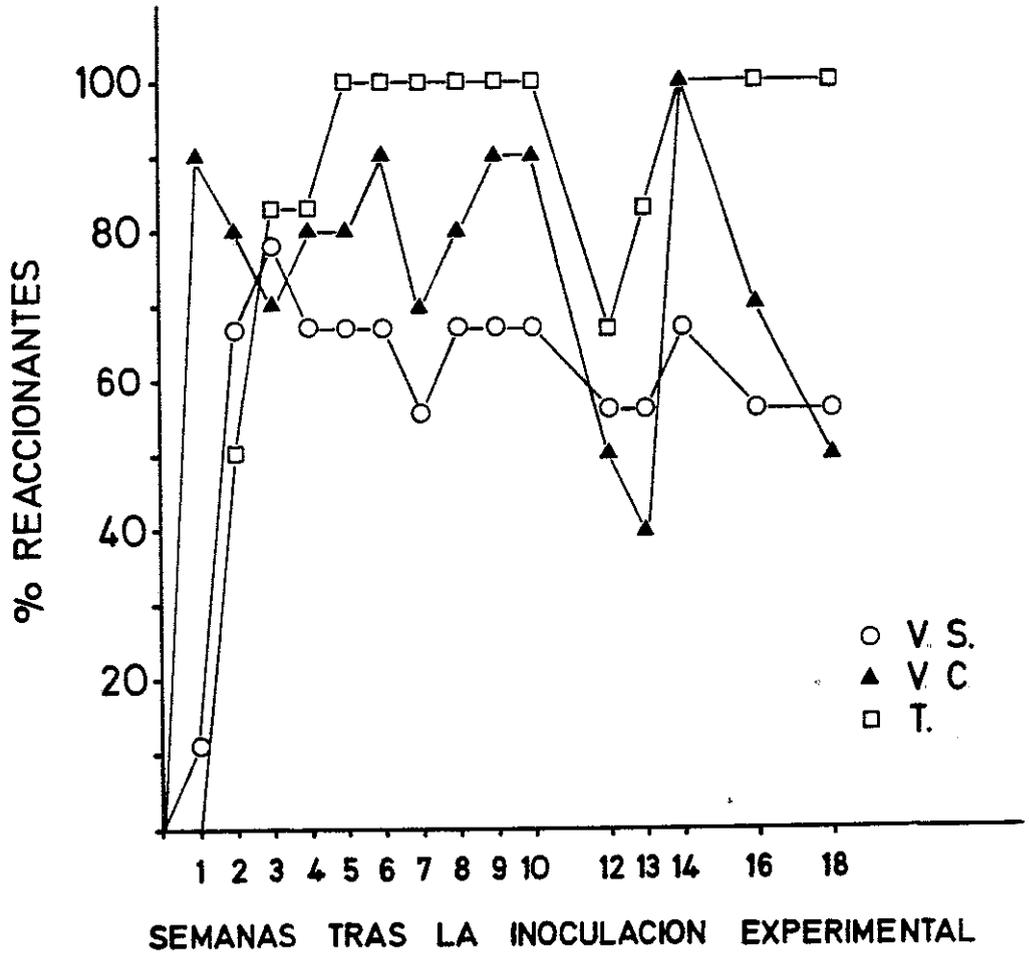


FIGURA 17. Evolución de la respuesta humoral en DDG con antígeno HS tras la infección experimental con B. ovis de moruecos adultos vacunados con Rev 1 (V.S.= Vacunados subcutáneamente; V.C. = Vacunados conjuntivamente; T = Testigos no vacunados).

experimental, el porcentaje de reaccionantes del lote testigo no vacunado fue mayor que el de los animales vacunados, permaneciendo así hasta el momento del sacrificio. Los moruecos vacunados conjuntivamente tuvieron, en general, una respuesta humoral ligeramente más intensa y temprana que los moruecos vacunados subcutáneamente.

4.3.4. Resultados clínicos, bacteriológicos y anatomopatológicos tras la infección experimental.

Mientras que dos animales del lote testigo no vacunado presentaron alteraciones testiculares, tan sólo un animal del lote vacunado por vía subcutánea desarrolló un absceso subescrotal que desapareció con el paso del tiempo. Los resultados del examen clínico y del estudio bacteriológico están expresados en el CUADRO 9. B. ovis se aisló en 4 (44,44 p. 100) de los animales vacunados subcutáneamente y en los 6 (100 p. 100) animales testigos no vacunados. La bacteria no se aisló de los moruecos vacunados conjuntivamente. Estos resultados indican que 10 (100 p. 100) de los moruecos vacunados conjuntivamente y 5 (55,56 p.100) de los moruecos vacunados subcutáneamente quedaron protegidos frente a las 3 sucesivas inoculaciones de B. ovis capaces de infectar al 100 p.100 de los animales testigos no vacunados. En

CUADRO 9. Alteraciones testiculares, infección bacteriológica y grado de la misma en los animales adultos vacunados subcutánea o conjuntivalmente con Rev 1 y sometidos a infección experimental con B. ovis. (Experiencia 2B. Ver 3.5.2.2. de Material y Métodos).

Grupo Animales	Nº de animales		Muestras sembradas		
	Alt. Clinicas	Infectados	DIF. (1)	Nº Positivas	DIF. (1)
V.S.	9	1 (11,11)	4 (44,44)	117	10 (8,54) ***
V.C.	10	-	-	130	-
Total	19	1 (5,26)	4 (21,05)	247	10 (4,05)
T	6	2 (33,33)	6 (100)	78	29 (37,18) ***

V.S.= Vacunados subcutáneamente.

V.C.= Vacunados conjuntivalmente.

T= Testigos no vacunados.

()= Porcentajes.

(1) χ^2 Pearson *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$

conjunto, la vacunación con Rev 1 protegió al 78,95 p. 100 de los animales utilizados. El número de muestras de órganos de los que se aisló B. ovis fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en el los animales del lote testigo no vacunado (37,18 p. 100) que en los vacunados subcutáneamente que llegaron a infectarse (8,54 p. 100).

En el CUADRO 10 se presenta la distribución de la infección en los distintos órganos de los animales que llegaron a infectarse tras la inoculación experimental. En general, la infección se encontró más ampliamente distribuida en los animales testigos no vacunados que en los cuatro vacunados por vía subcutánea que resultaron infectados. Sin embargo, en el grupo de animales testigos no vacunados hubo grandes variaciones en la distribución de la infección entre animales. B. ovis se aisló de un animal en 10 órganos, de 2 animales en 6, de 1 animal en 4, de 1 animal en 2 y de otro animal en un único órgano. Lo mismo ocurrió con los animales vacunados en los que se puso en evidencia B. ovis. Uno de estos animales estaba muy infectado (de un epidídimo se aislaron más de 625 colonias por placa, distribuyéndose la infección en 5 órganos), mientras que de los otros tres moruecos vacunados que llegaron a infectarse, se aislaron colonias muy aisladas en 3 órganos de un animal, en dos

CUADRO 10. Distribución de B. ovis en los órganos de los moruecos adultos vacunados subcutánea o conjuntivamente con Rev 1 que resultaron infectados tras la inoculación experimental. (Experiencia 2B. Ver 3.5.2.2. de Material y Métodos).

Grupos	N ^o Aislamientos		
	V.S.	V.C.	T
N ^o de moruecos infectados	4	-	6
Organos			
Hígado	-	-	1
Bazo	-	-	4
Testículo derecho	1	-	-
Epidídimo derecho	1	-	2
Testículo izquierdo	-	-	1
Epidídimo izquierdo	1	-	3
Vesículas seminales	2	-	4
Glándulas bulbouretrales	1	-	3
Ampollas del conducto deferente	2	-	4
Ganglios ilíacos	1	-	2
Ganglios crurales	1	-	1
Ganglios escapulares	-	-	2
Ganglios de la cabeza ^(*)	1	-	1

V.S.= Vacunados subcutáneamente.

V.C.= Vacunados conjuntivamente.

T= Testigos no vacunados.

(*) submaxilares + parotideos + retrofaringeos.

de otro y en uno de otro.

En el CUADRO 11 se expresa de forma esquemática el grado de lesiones microscópicas de los distintos lotes de animales en los órganos estudiados. La clasificación del grado de las lesiones se realizó de igual forma que en la experiencia anterior (ver 4.2.4., Resultados). Todos los animales testigos presentaron lesiones en los testículos, dos de carácter grave y dos leve, mientras que únicamente uno de los animales vacunados por vía subcutánea tenía lesiones graves en este órgano. Ninguno de los animales vacunados presentó lesiones graves en epidídimo, y tan sólo dos de los vacunados conjuntivamente y 4 de los vacunados subcutáneamente mostraron lesiones de carácter leve, localizadas principalmente en la cola del epidídimo. Cuatro de los testigos no vacunados presentaron lesiones en la cola del epidídimo, siendo una de ellas de carácter grave. La intensidad y distribución de las lesiones en las vesículas seminales de los tres lotes fue semejante a la observada en los epidídimos. Las lesiones observadas en las ampollas de conducto deferente tuvieron similar intensidad y distribución en los animales testigos no vacunados y en los animales vacunados subcutáneamente, siendo más leves en los vacunados conjuntivamente. En las glándulas bulbouretrales de los tres lotes, tan sólo se observaron

CUADRO 11. Grado de las lesiones microscópicas observadas tras la infección experimental en los moruecos adultos vacunados subcutánea o conjuntivalmente con Rev 1. (Experiencia 2B. Ver 3.5.2.2. de Material y Métodos).

Organo	Intensidad	Nº Moruecos		
		V.S.	V.C.	T
Testículo	Grave	1	-	2
	Leve	6	5	4
	Inexistente	2	5	-
Gándulas bulbouretrales	Grave	-	-	-
	Leve	4	3	2
	Inexistente	5	7	4
Vesículas seminales	Grave	-	-	1
	Leve	4	2	2
	Inexistente	5	8	3
Epidídimo	Grave	-	-	1
	Leve	4	2	3
	Inexistente	5	8	2
Ampollas	Grave	1	-	2
	Leve	5	3	3
	Inexistente	3	7	1

V.S.= Vacunados Subcutáneamente.

V.C.= Vacunados Conjuntivalmente.

T= Testigos no vacunados.



lesiones de carácter leve.

4.4. Resultados de la experiencia n^o3: Eficacia del tratamiento antibiótico de la infección por B. ovis

4.4.1. Evolución de la respuesta humoral tras la infección experimental y tras el tratamiento.

La evolución de la respuesta humoral en el ELISA y DDG con antígeno HS tras la inoculación experimental y el tratamiento, se representa en la FIGURA 18. Cuatro semanas después de la infección experimental todos los animales reaccionaban positivamente en DDG, alcanzando el título medio máximo en ELISA en la octava semana post-infección. Después del inicio del tratamiento (semana 17), se apreció una ligera disminución del título medio de anticuerpos en el ELISA y del porcentaje de reaccionantes en DDG en los animales tratados con Terramicina, mientras que los animales sometidos al tratamiento combinado de Terramicina y Estreptomina mantuvieron invariable su respuesta serológica.

4.4.2. Resultados clínicos, bacteriológicos y anatomopatológicos.

El primer síntoma palpable de epididimitis se apreció en un animal a la sexta semana

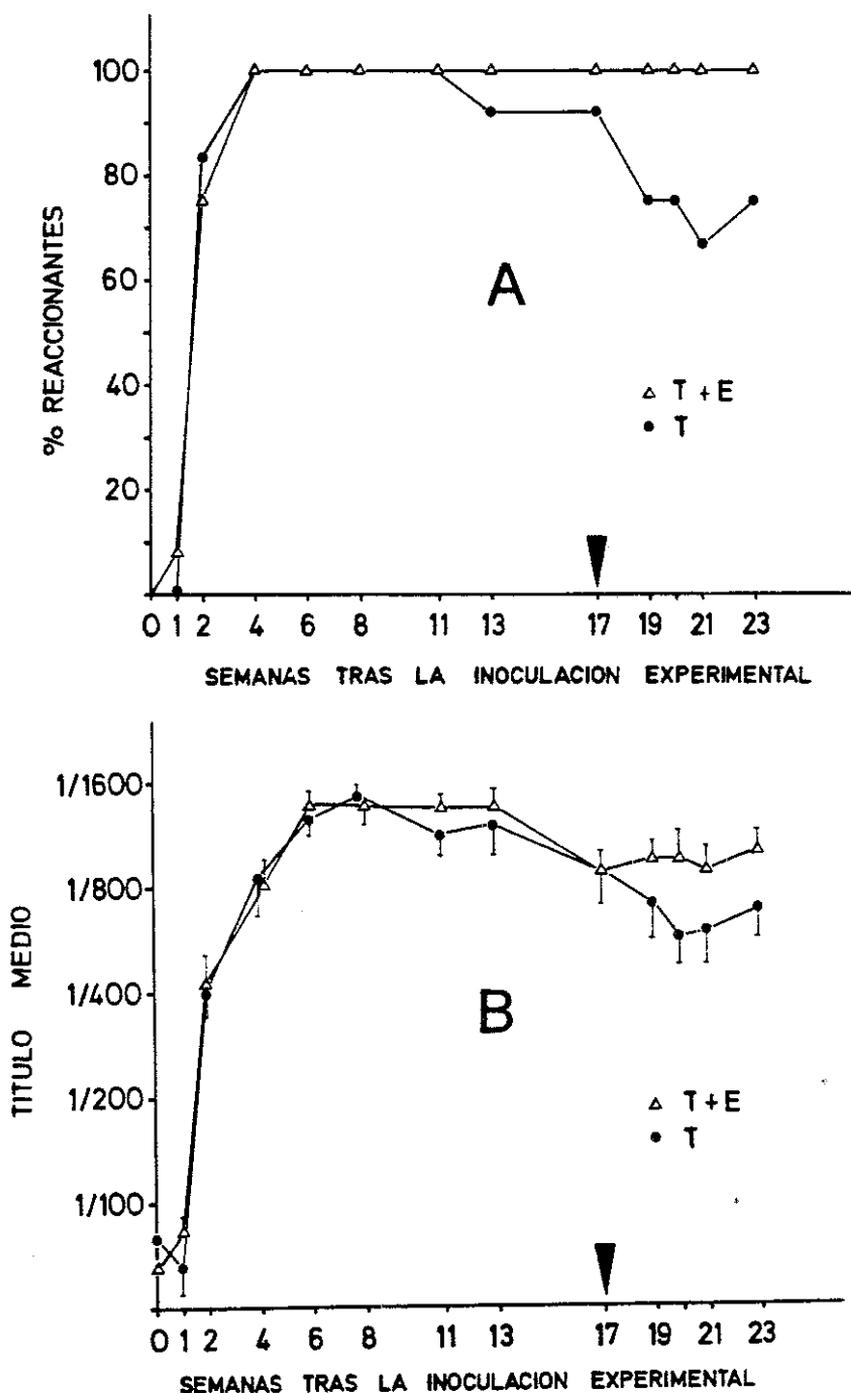


FIGURA 18. Evolución de la respuesta humoral en DDG (Fig. A) y ELISA (Fig. B) con antígeno HS tras la infección experimental con *B. ovis* de moruecos sometidos a tratamiento antibiótico posterior (T+E = Tratados con Terramicina y Estreptomicina; T = Tratados con Terramicina; ▼ = Comienzo del tratamiento antibiótico).

tras la inoculación experimental. Dos semanas más tarde, esta misma lesión fue detectada en otro animal.

Once semanas después de la inoculación experimental, los 24 animales eliminaban B. ovis por su semen. La excreción seminal de B. ovis durante el tratamiento antibiótico se presenta en el CUADRO 12. Como puede apreciarse en dicho cuadro, la excreción cesó en todos los animales sometidos al tratamiento combinado de Terramicina y Estreptomina en la segunda semana tras el inicio del tratamiento, mientras que hubo tres animales tratados sólo con Terramicina que excretaban B. ovis al final del mismo. La excreción seminal de B. ovis durante el tratamiento fue intermitente en el grupo tratado sólo con Terramicina. En conjunto, sólo dos animales del tratamiento combinado excretaron la bacteria durante el tratamiento mientras que hubo seis animales que lo hicieron en el grupo de los tratados sólo con Terramicina.

Los resultados del examen clínico y bacteriológico de los animales tras el sacrificio de los mismos, se presentan en el CUADRO 13. Ninguno de los tratamientos resolvió las lesiones de epididimitis en los dos animales afectados antes de que el tratamiento comenzase. El porcentaje de animales infectados y el nivel de infección (porcentaje de muestras positivas

CUADRO 12. Excreción seminal de B. ovis durante el tratamiento antibiótico de los moruecos infectados experimentalmente (Experiencia 3. Ver 3.5.3. de Material y Métodos).

Tratamiento	Nº Moruecos	Excreción durante el tratamiento				
		Antes	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Después
T	12	12	5	2	3	3
T+E	12	12	2	-	-	-

T= Tratamiento con Terramicina.

T+E= Tratamiento con Terramicina y Estreptomina.

CUADRO 13. Alteraciones testiculares, infección bacteriológica y grado de la misma en los moruecos infectados por B. ovis y tratados con antibióticos. (Experiencia 3. Ver 3.5.3. de Material y Métodos).

Grupo Animales	Nº Animales		Muestras sembradas	
	Alt. Clínicas	Infectados DIF. (1)	Nº	Nº Positivos DIF. (1)
T	1 (8,3)	8 (66,66)	156	59 (37,8)
T+E	1 (8,3)	1 (8,3)	156	1 (0,6) ***

T= Tratamiento con Terramicina.

T+E= Tratamiento con Terramicina y Estreptomomicina.

() = Porcentajes.

(1) χ^2 Pearson *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$



bacteriológicamente) fueron significativamente menores en el grupo sometido a tratamiento combinado que en los animales tratados sólo con Terramicina. Un hecho destacable fue que del animal afectado de epididimitis del grupo tratado con Terramicina y Estreptomicina no se aisló B. ovis, ni ningún otro patógeno .

La distribución de B. ovis en los diferentes órganos de los animales sometidos a tratamiento antibiótico que aparecieron infectados tras la necropsia, esta esquematizada en el CUADRO 14. Los principales órganos de localización de la bacteria fueron las glándulas bulbouretrales y las ampollas del conducto deferente, en las que B. ovis se aisló de los 8 animales tratados con Terramicina que resultaron infectados. Sin embargo, la bacteria tan solo fue aislada del epidídimo del único animal tratado con Terramicina y Estreptomicina que apareció infectado tras la necropsia.

En el CUADRO 15 se expresa de forma esquemática el grado de lesiones microscópicas en los distintos lotes de animales. Las lesiones microscópicas fueron clasificadas subjetivamente como en las experiencias anteriores. Como puede apreciarse en dicho cuadro, ambos grupos de animales no presentaron lesiones graves en los testículos ni en las glándulas

CUADRO 14. Distribución de B. ovis en los órganos de los moruecos infectados tras el tratamiento con antibióticos. (Experiencia 3. Ver 3.5.3. de Material y Métodos).

Grupos	N ^o Aislamientos	
	T	T+E
N ^o de Moruecos infectados	8	1
Organos		
Hígado	3	-
Bazo	2	-
Testículo derecho	2	-
Epidídimo derecho	6	1
Testículo izquierdo	2	-
Epidídimo izquierdo	5	-
Vesículas seminales	5	-
Gándulas bulbouretrales	8	-
Ampollas del conducto deferente	8	-
Ganglios ilíacos	5	-
Ganglios crurales	4	-
Ganglios escapulares	4	-
Ganglios de la cabeza ^(*)	2	-

T= Tratamiento con Terramicina

T+E= Tratamiento con Terramicina y Estreptomicina.

(*) submaxilares + parotideos + retrofaringeos.

CUADRO 15. Grado de las lesiones microscópicas observadas en los moruecos infectados por B. ovis y tratados con antibióticos. (Experiencia 3. Ver 3.5.3. de Material y Métodos).

Organo	Intensidad	Nº Moruecos	
		T	T+E
Testículo	Grave	-	-
	Leve	3	3
	Inexistente	9	9
Gándulas bulbouretrales	Grave	-	-
	Leve	6	5
	Inexistente	6	7
Vesículas seminales	Grave	2	-
	Leve	5	4
	Inexistente	5	8
Epidídimos	Grave	1	5
	Leve	5	4
	Inexistente	6	3
Ampollas	Grave	7	7
	Leve	3	5
	Inexistente	2	-

T= Tratados con Terramicina.

T+E= Tratados con Terramicina y Estreptomycinina.

bulbouretrales. Además, las vesículas seminales de los animales sometidos a tratamiento combinado no presentaron lesiones graves. Sin embargo, 7 animales de cada grupo mostraron lesiones graves en las ampollas de conducto deferente y 5 animales del tratamiento combinado y uno tratado sólo con Terramicina, presentaron lesiones graves en el epidídimo. Es destacable que sólo se aisló B. ovis de uno de los 5 moruecos sometidos al tratamiento combinado que presentaban lesiones microscópicas graves en el epidídimo.

5. DISCUSION

Las tres técnicas serológicas comparadas poseen una adecuada sensibilidad y especificidad para el diagnóstico serológico de la infección por B. ovis, presentando variaciones de sensibilidad según el antígeno utilizado.

La sensibilidad y especificidad de estas reacciones serológicas dependen principalmente de la naturaleza de los antígenos utilizados (9, 173). Los antígenos solubles de la superficie de B. ovis presentan mejor valor diagnóstico que los antígenos constituidos por suspensiones de células completas (42). Dentro de los antígenos obtenidos por fraccionamiento de suspensiones celulares de B. ovis, los preparados mediante extracción salina caliente (antígenos HS o similares) tienen mejor sensibilidad en FC que los extraídos por ultrasonidos (9). Los antígenos obtenidos por sonicación podrían ser la causa de falsos positivos en ELISA (129) y DDG (123) al ser antígenos comunes a todo el género Brucella (48). Este problema es especialmente importante en países donde coexisten las infecciones por B. ovis y B. melitensis, o cuando los animales se vacunan con la cepa Rev 1 (131). Los antígenos obtenidos mediante disolventes orgánicos también han sido utilizados para el diagnóstico de la infección por B. ovis. Un antígeno

de naturaleza exclusivamente lipopolisacáridica obtenido por el método de Galanos et al. (74), ha sido empleado en un test ELISA dando mejor sensibilidad que los antígenos obtenidos mediante sonicación o mediante extracción salina caliente (2). Sin embargo, otros autores que utilizaron el antígeno HS en el ELISA, han obtenido una sensibilidad ligeramente superior a la obtenida con el antígeno LPS-R extraído por el método de Galanos (131, 22).

En el presente trabajo, el antígeno obtenido mediante extracción salina caliente (HS) (52) ha proporcionado siempre mejor nivel de sensibilidad que el antígeno RG, obtenido por el método de Galanos et al. (74). La explicación de este resultado podría estar en la disposición estructural de los distintos componentes de la superficie de B. ovis. Por tratarse de una bacteria rugosa, la longitud de la cadena terminal de polisacárido está reducida y otros componentes de la membrana externa tales como las proteínas de membrana externa (PME) estarían más expuestas al medio externo (131), produciendo el animal infectado tanto anticuerpos frente al LPS-R como a otros componentes membranales. Puesto que el antígeno HS está constituido mayoritariamente por una asociación de LPS-R y PME (131), con este antígeno se detecta tanto una respuesta humoral frente al LPS-R como a otros determinantes

antigénicos que no están presentes en el LPS-R obtenido por disolventes orgánicos (131). Por otra parte, dada la naturaleza exclusivamente lipopolisacáridica del antígeno RG, sería esperable que las reacciones cruzadas con especies lisas del género Brucella no existiesen cuando se usara este antígeno, haciéndolo interesante para el diagnóstico. Sin embargo, ha sido demostrado que animales infectados por B. melitensis o vacunados con Rev 1, son seropositivos en un test ELISA con antígeno RG (131, 22). Además de estos inconvenientes, este extracto antigénico posee una elevada hidrofobicidad lo que dificulta su empleo en las pruebas serológicas (131, 22).

No existe información sobre la existencia de diferencias en antigenicidad de las preparaciones obtenidas de la cepa estándar REO 198 con las de las cepas virulentas. Con la finalidad de aportar información en este aspecto, realizamos una comparación del valor diagnóstico del extracto salino obtenido de la cepa 198 (HS) con la misma preparación obtenida de una cepa virulenta de B. ovis (HS-V), utilizada para realizar las infecciones experimentales de los carneros. Las dos preparaciones antigénicas (HS y HS-V) se comportaron de forma parecida en FC y ELISA. Sin embargo, cuando se compararon en DDG presentaron diferencias de sensibilidad, aunque no fueron muy

significativas desde el punto de vista estadístico.

Aunque el valor diagnóstico de los antígenos citoplasmáticos de Brucella ha sido bien estudiado en la especie humana (53) y en ganado ovino infectado por B. melitensis (151), no existía información sobre su valor diagnóstico en ganado ovino infectado por B. ovis. En nuestro estudio, el extracto antigénico citoplasmático (SP) no demostró ser de gran utilidad diagnóstica. Además de tener una baja sensibilidad en DDG (54,23 p. 100) y en el ELISA (59,04 p. 100), no mejoró la sensibilidad obtenida en estas mismas pruebas cuando se utilizaban antígenos de superficie. En infecciones humanas por Brucella se han demostrado anticuerpos fijadores del complemento en el líquido cefalorraquídeo frente al antígeno SP (55). Por otra parte, en cobayos infectados experimentalmente por B. abortus también han sido evidenciados anticuerpos fijadores del complemento frente al antígeno SP (91). En las diversas condiciones estudiadas por nosotros, el antígeno SP no funcionó en la prueba de FC. Esto pudo ser debido bien a un defecto en la puesta a punto de la técnica o bien a que el antígeno SP no fija el complemento con sueros ovinos.

De lo anteriormente expuesto y de los resultados obtenidos en nuestro estudio puede deducirse que el antígeno HS es el más idóneo para el diagnóstico

serológico de la infección por B. ovis. Cuando este antígeno (obtenido de la cepa REO 198) se utilizó en el ELISA se obtuvo una sensibilidad (97,59 p. 100) superior a la obtenida en FC (92,77 p. 100) y en DDG (96,38 p. 100) con el mismo antígeno. Sin embargo, estas diferencias no son significativas desde el punto de vista estadístico. Este hecho parece lógico si se considera que el antígeno usado es el mismo y que las inmunoglobulinas que intervienen en las tres pruebas son mayoritariamente de la clase IgG (132).

La FC es la prueba más universalmente utilizada para el diagnóstico serológico de la infección por B. ovis. En nuestro trabajo presentó buenos índices de sensibilidad y especificidad aunque siempre inferiores a los obtenidos en DDG o ELISA, resultados que concuerdan con los de otros autores (94, 121, 123, 129, 137, 146). La FC es una técnica automatizable que permite analizar gran número de muestras pero que, a nuestro juicio, presenta grandes inconvenientes de orden técnico (ver Revisión Bibliográfica 2.2.1.).

En las condiciones estudiadas por nosotros, la prueba de DDG ha demostrado ser muy sensible (96,38 p. 100) para el diagnóstico de la infección por B. ovis. Resultados similares han sido obtenidos por otros autores (88, 121, 123). Cuando es utilizada

correctamente (molaridad de ClNa en el gel idónea y antígeno convenientemente titulado), por su sencillez, rapidez y economía es la prueba más adecuada para "screening" en programas de control de la infección por B. ovis. Los principales inconvenientes de esta técnica, son que sólo proporciona resultados cualitativos, que no es automatizable y que no está estandarizada.

La prueba ELISA es muy sensible, siendo capaz de detectar niveles muy bajos de anticuerpos (88, 101, 149). En nuestro estudio resultó ser la técnica más sensible para el diagnóstico de la infección por B. ovis (hasta un 98,79 p. 100 de sensibilidad con un 100 p. 100 de especificidad con el antígeno HS-V). Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores en ensayos comparativos similares (2, 137, 146, 172, 173). Esta técnica permite el procesado de gran número de sueros en poco tiempo y, al igual que la DDG, permite trabajar con sueros hemolizados o que presentan poder anticomplementario (172). El principal inconveniente de esta prueba es que no existe un estándar internacional. Entre los factores de variación en la realización de la prueba que se encuentran descritos en la literatura, el sustrato utilizado es quizá el más frecuente. En el presente trabajo se compararon los sustratos 5-AS, ABTS y OPD ya que son los que aparecen citados mayoritariamente para la realización del ELISA. Aunque

no se encontraron diferencias significativas en cuanto a sensibilidad y especificidad, con el sustrato ABTS las diferencias de color y por tanto de Densidad Optica entre los sueros positivos y negativos fueron mayores. Esta mejor resolución permitía incluso una lectura visual de las placas, ventaja de gran interés práctico.

Teniendo presente que existen multitud de factores de variación de los resultados, un problema importante para la estandarización del ELISA es determinar el umbral a partir del cual un suero se puede considerar positivo o negativo. Para intentar resolver este problema, con los sueros controles positivos y negativos se determinó primero la dilución óptima de suero a utilizar en la prueba y en segundo lugar, a partir de qué Densidad Optica un determinado suero podría ser considerado positivo. Así por ejemplo, con el antígeno HS, el sustrato ABTS, con una dilución de suero $1/800$ y realizando la lectura a 412 nm en nuestro espectrofotómetro, un suero podía ser considerado positivo cuando tenía una absorbancia mayor o igual a 0,7 y negativo cuando esta era menor a 0,7. Con estas condiciones se lograba detectar 81 sueros de los 83 positivos, mientras que los 83 sueros de la población libre de Brucella eran negativos (97,59 p. 100 de sensibilidad y 100 p. 100 de especificidad). Sin embargo, estas condiciones pueden variar para cada lote



diferente de antígeno, de conjugado, de sustrato y de placas de ELISA. Este problema ha intentado resolverse mediante la utilización de índices o fórmulas matemáticas (77, 152).

Nosotros hemos utilizado el criterio antes mencionado (Ver 3.3.4. de Material y Métodos) basado en la representación mediante histogramas de frecuencias de los valores de DO de las dos poblaciones control. Este mismo criterio ha sido empleado por otros autores (5, 131).

Para la adecuada utilización del ELISA en un programa de erradicación, esta prueba debería ser estandarizada correctamente para las condiciones de cada laboratorio, utilizando como control unas poblaciones suficientemente numerosas de sueros positivos y negativos, bacteriológicamente contrastadas.

En nuestro estudio comparativo de las técnicas serológicas, ninguna de las tres pruebas consideradas individualmente detectó el 100 p. 100 de los animales infectados, aunque las tres resultaron 100 p. 100 específicas. El ELISA dió los mejores resultados diagnósticos seguido por la DDG, mientras que la FC presentó los peores, aunque las diferencias no fueron estadísticamente muy significativas. En general, estos

resultados son similares a los obtenidos por otros autores (2, 129, 137, 146, 158, 172, 173)).

En la prueba ELISA, 2 de los 83 sueros controles positivos resultaron negativos, mientras que hubo 3 en DDG y 6 en FC. Sin embargo, los 2 sueros de los animales infectados que dieron resultados negativos en el ELISA, fueron detectados en DDG y los 3 sueros de animales infectados que fueron negativos en DDG fueron positivos en el ELISA. La FC no mejoró la sensibilidad del ELISA ni la de la DDG. En consecuencia, con la combinación de los resultados del ELISA y la DDG todos los animales infectados fueron diagnosticados como tal. La necesidad de utilizar 2 o más pruebas diagnósticas para optimizar los resultados serológicos ha sido ya sugerida por algunos autores (73).

A nuestro juicio, la técnica de DDG sería la prueba diagnóstica más adecuada para usarse como "screening" en un programa de erradicación a gran escala, por las ventajas apuntadas anteriormente, su elevada sensibilidad y especificidad y porque no requiere ni personal ni equipamiento especial en el laboratorio. Los sueros negativos en DDG deberían ser analizados en el ELISA con la finalidad de obtener la máxima sensibilidad. Es preciso considerar que la especificidad de las técnicas serológicas para B. ovis puede fallar en

el caso de animales infectados por B. melitensis o vacunados con Rev 1 (131, 22). Por lo tanto, para un diagnóstico adecuado en nuestro país, donde coexisten las infecciones por B. melitensis y por B. ovis y se practica la vacunación con Rev 1, sería recomendable que los sueros ovinos se analizasen conjuntamente en pruebas serológicas con antígenos lisos (Rosa Bengala y FC) y en las pruebas mencionadas anteriormente para B. ovis.

La cepa Rev 1 de B. melitensis es ampliamente utilizada en nuestro país para la profilaxis de la infección por B. melitensis en el ganado ovino y caprino de reposición. Esta vacuna se elabora con una cepa lisa, y sin embargo, ha sido demostrado que protege frente a la infección por B. ovis (23, 69, 76, 81, 154). El mecanismo de dicha protección es desconocido.

En nuestros experimentos, la vacuna Rev 1 no ha producido alteraciones testiculares, ni cuando se usó en carneros jóvenes de 6 meses de edad, ni vacunando moruecos adultos de más de un año. De igual forma, tampoco pudo ser aislada del semen ni de los órganos de los animales vacunados cuando se analizaron post-mortem. Todos estos resultados están de acuerdo con los descritos por otros autores (23, 69, 76, 81, 154). Sin embargo, la cepa Rev 1 ha sido aislada de un morueco vacunado que desarrolló epididimitis (102). Aunque este

efecto secundario de la vacuna parece ser muy poco frecuente, la inocuidad de la vacuna para los carneros debería ser confirmada en una campaña de vacunación a gran escala.

El problema de la vacunación subcutánea con dosis estándar de Rev 1 (1×10^9 UFC) es que se produce una intensa respuesta humoral que dura bastante tiempo y que puede interferir en el diagnóstico de las infecciones por B. melitensis. La respuesta humoral puede prolongarse hasta más de un año en las pruebas de RB y FC tras la vacunación (23). Además, se ha demostrado que algunos animales vacunados con Rev 1 dan reacciones cruzadas con el antígeno HS durante los primeros meses después de la vacunación (23), interfiriendo con el diagnóstico serológico de B. ovis. Por lo tanto, la intensa respuesta humoral producida tras la vacunación subcutánea interfiere el diagnóstico serológico de las infecciones por Brucella en ganado ovino, por lo que la puesta a punto de métodos alternativos de vacunación que disminuyan la respuesta humoral sin perder eficacia inmunizante, es de gran importancia práctica.

La utilización de la vacuna Rev 1 por vía conjuntival en hembras ovinas proporciona una protección equivalente a la vacunación subcutánea frente a la infección por B. melitensis, produciendo una respuesta humoral mucho

menos intensa (70, 72). Sin embargo, este método de vacunación no había sido aplicado en carneros.

Cuando en nuestros experimentos se compararon las vías de administración subcutánea y conjuntival de la vacuna Rev 1 en moruecos jóvenes, no se encontraron diferencias significativas en cuanto al grado de protección conferido frente a la infección por B. ovis. Sin embargo, mientras que la totalidad de animales vacunados por vía subcutánea eran positivos en la prueba de FC con antígeno liso a los cuatro meses de la vacunación, todos los animales vacunados conjuntivalmente eran negativos en la misma prueba. Un año después de la vacunación un 10 p. 100 de los animales vacunados subcutáneamente eran todavía positivos en FC.

Los resultados del examen bacteriológico de la experiencia de vacunación de carneros jóvenes confirman que los órganos de localización preferente de la infección son las vesículas seminales y las ampollas del conducto deferente. Estos mismos resultados han sido obtenidos por otros autores (23, 69). Esto puede explicar el hecho de que muchos animales infectados no presenten alteraciones testiculares y la importancia de la vía sexual en la diseminación de la enfermedad (29, 86, 96, 105, 111, 144).

Las lesiones macro y microscópicas observadas en los órganos reproductivos coinciden en términos generales con las descritas por otros autores (17, 23, 98). En las vesículas seminales observamos lesiones en el tejido intersticial idénticas a las descritas por otros (10), pero además observamos intensa hiperplasia epitelial, formación de quistes intraepiteliales e infiltrados de células redondas en el tejido muscular. Las lesiones observadas en los animales vacunados (bien por vía subcutánea o conjuntival) han sido siempre de menor intensidad e importancia que las observadas en los animales testigos, lo que viene a apoyar la eficacia de la vacunación.

La evaluación de la respuesta humoral producida tras la inoculación experimental fué de poca utilidad para confirmar la eficacia de la vacunación; debido al corto periodo de observación. En general, la respuesta humoral de los animales vacunados que quedan protegidos adecuadamente suele ser menos intensa que la de los animales testigos infectados (23). En nuestra experiencia de vacunación de carneros jóvenes, la evolución de la serología tras la inoculación experimental siguió un patrón semejante al mencionado.

Cuando se compararon las vías subcutánea y

conjuntival para la administración de la vacuna Rev 1 en moruecos adultos, se encontraron diferencias en cuanto al grado de protección conferido frente a B. ovis. La vacuna conjuntival protegió mejor a los moruecos que la vacunación subcutánea (100 p. 100 vs 55,56 p. 100, respectivamente). La respuesta humoral producida tras la vacunación fué de nuevo menos intensa y duradera en los animales vacunados conjuntivalmente, pero las diferencias no fueron tan espectaculares como en el caso anterior. Los resultados bacteriológicos de la experiencia de vacunación de carneros adultos señalan como órganos de localización preferente de la infección el bazo, las vesículas seminales y las ampollas del conducto deferente. Por lo tanto no parecen existir diferencias en este aspecto entre animales jóvenes o adultos sometidos a infección experimental con B. ovis. En general, el grado de las lesiones macro y microscópicas observadas en los moruecos testigos fue más grave que en los vacunados. Estos resultados son muy similares a los de la experiencia anterior y a los obtenidos por otros (10, 23). Al igual que en el caso anterior, la respuesta serológica tras la inoculación fué difícil de interpretar. En general todos los animales vacunados presentaron una respuesta serológica frente al antígeno HS más precoz y menos duradera que los animales testigo.

Los resultados bacteriológicos obtenidos en la experiencia n° 3, sugieren que la infección de B. ovis de los carneros puede ser tratada eficazmente con antibióticos. El tratamiento combinado de Terramicina y Estreptomicina curó desde el punto de vista bacteriológico 11 de los 12 moruecos infectados. El tratamiento con Terramicina sola, únicamente eliminó B. ovis del 33.33 p. 100 de los carneros infectados. Para determinar si las cepas aisladas tras el tratamiento presentaban una resistencia a los antibióticos distinta a la de la cepa utilizada para la inoculación, se determinó in vitro antes y después del tratamiento la sensibilidad de B. ovis a los antibióticos. Las cepas aisladas después del tratamiento mostraron el mismo patrón de sensibilidad que la cepa utilizada para infectar a los animales. Este mismo resultado ha sido descrito en vacas infectadas por B. abortus y tratadas con antibióticos (82), sugiriendo que la falta de eficacia del tratamiento in vivo no era debida a la creación de resistencia por la cepa a los antibióticos.

La persistencia in vivo de las especies de Brucella se produce principalmente dentro de las células fagocíticas del sistema reticuloendotelial (45). La antibioterapia convencional puede fallar en estas condiciones debido a la incapacidad de los antibióticos para cruzar las membranas celulares. Por esta razón,

para destruir bacterias intracelulares es necesario mantener altos niveles de antibiótico durante largos periodos de tiempo (84).

En nuestra experiencia, la Estreptomocina actuó como sinérgica de la Terramicina para destruir B. ovis. Resultados similares han sido obtenidos para B. abortus en macrófagos bovinos cultivados in vitro (130) y también en experiencias llevadas a cabo en vacas (112, 125). A pesar de que B. ovis fue aislada en todos los animales infectados de órganos que intervienen en la elaboración del semen, sólo 3 de los tratados con Terramicina excretaron B. ovis en el semen al final del tratamiento. Este hecho y la posibilidad demostrada de una localización extragenital de B. ovis en los moruecos infectados (23), sugiere que el cultivo de semen y el exámen bacteriológico de los testículos y epidídimos no es una forma válida para determinar la eficacia de los tratamientos. Esta errónea metodología fue la que se aplicó en las dos únicas experiencias publicadas sobre tratamiento antibiótico de B. ovis (78, 100).

El alto coste de los tratamientos es uno de los factores aducidos como limitantes para su aplicación. El precio actual de un morueco en España varía desde 15.000 a 50.000 pesetas dependiendo de la raza y del valor genético del animal. El coste del tratamiento combinado



de Terramicina y Estreptomicina fue de 2.600 pts. por animal.

En la brucelosis humana, después de un tratamiento antibiótico con éxito, los títulos serológicos decrecen lentamente y transcurre mucho tiempo hasta que desaparecen completamente, caso de que lo hagan. Esta seroconversión se utiliza para valorar la eficacia del tratamiento. Según esto, la evaluación de los resultados serológicos obtenidos poco tiempo después del tratamiento tiene una eficacia muy limitada (112). El corto periodo de tiempo transcurrido entre el tratamiento y el sacrificio de los animales en nuestro estudio, no permitió evaluar los resultados serológicos para interpretar la eficacia de los tratamientos.

Desde el punto de vista anatomopatológico, la aparente buena eficacia del tratamiento no resultó clara en nuestro experimento. El tratamiento combinado curó bacteriológicamente el 91,6 p. 100 de los animales infectados, pero no fue capaz de hacer desaparecer la epididimitis clínica presente en un animal al principio del tratamiento. Además, los epidídimos de 5 moruecos sometidos a este tratamiento y las ampollas del conducto deferente de 7 animales del mismo tratamiento, presentaron lesiones microscópicas graves. A pesar de que las lesiones anatomopatológicas de estos animales

fueron menos intensas que las observadas en los testigos de nuestras otras experiencias y las descritas en animales similarmente infectados (23), no es posible llegar a la conclusión de que la curación bacteriológica equivale a la curación de las lesiones y a asumir que los animales recuperarán completamente su funcionalidad reproductiva. Esto podría explicar la defectuosa calidad del semen observada en algunos moruecos que dejaron de excretar B. ovis en el semen tras un tratamiento antibiótico considerado eficaz desde el punto de vista bacteriológico (100).

Por lo tanto, para sacar conclusiones más sólidas sobre la eficacia de la antibioterapia para el tratamiento de la infección por B. ovis, deben realizarse experimentos adicionales en los que sean llevados a cabo exámenes histológicos a largo plazo y comprobar los niveles de fertilidad de los animales tratados por medio de cubriciones controladas.



CONCLUSIONES

1. El antígeno obtenido por extracción salina caliente (HS) ha proporcionado mejores resultados diagnósticos que las otras dos preparaciones antigénicas utilizadas.

El obtenido mediante Cloroformo-Eter de petróleo-Fenol (RG) no dió resultados en la prueba de Doble Difusión en Gel (DDG) debido a su elevada hidrofobicidad. Por otra parte, el antígeno obtenido por extracción salina fría (SP) no se logró utilizar en Fijación del Complemento (FC), a pesar de los numerosos ensayos realizados.

2. Las diferencias en los niveles de sensibilidad y especificidad obtenidos en la prueba ELISA, parecen depender fundamentalmente del antígeno y no del tipo de sustrato empleado. Las diferencias de sensibilidad obtenidas con los sustratos 5-AS, ABTS y OPD con el antígeno HS no fueron estadísticamente significativas. Los mejores resultados individuales se obtuvieron con los sustratos 5-AS y ABTS. Sin embargo, la resolución (separación más neta de poblaciones positiva y negativa) obtenida con el sustrato ABTS fue la mejor, permitiendo incluso la interpretación visual de los resultados, aspecto de indudable interés práctico.

3. Las tres técnicas serológicas comparadas (ELISA, DDG y FC) cuando se utilizan con el antígeno HS poseen una sensibilidad y especificidad idóneas para el diagnóstico serológico de la infección por B. ovis. Aunque las diferencias obtenidas no fueron significativas desde el punto de vista estadístico, los mejores resultados diagnósticos se obtuvieron con la prueba ELISA. La prueba de DDG dio mejor sensibilidad que la FC y la asociación de las pruebas de DDG y ELISA proporcionó la máxima sensibilidad. Sin embargo la prueba de FC no mejoró la sensibilidad individual de las anteriores. Ninguna de las tres pruebas comparadas dio resultados falsos positivos con los 83 sueros de los animales control negativo analizados.

Por su sencillez, rapidez y economía la DDG debería ser la prueba más recomendable para el diagnóstico de la infección en nuestro país en programas de control a gran escala. Los sueros negativos en DDG deberían analizarse en el ELISA con la finalidad de obtener la máxima sensibilidad.

4. (a) La vacuna Rev 1 administrada por vía subcutánea a dosis estándar en moruecos de alrededor de 3 a 6 meses de edad, los protege adecuadamente frente a una infección experimental de B. ovis capaz de infectar la totalidad de los animales controles no vacunados

utilizados. Esta vía de administración de la vacuna produce una respuesta serológica intensa y prolongada que interfiere con el diagnóstico serológico de B. melitensis. Ello se resuelve mediante la utilización de la vía conjuntival para la administración de la vacuna. Sin embargo, el nivel de protección obtenido frente a B. ovis ha sido inferior al conferido por la vacunación subcutánea, aunque las diferencias obtenidas no fueron significativas.

(b) La vacuna Rev 1 administrada por vía conjuntival en moruecos adultos ha protegido mejor a los animales que cuando se utiliza por vía subcutánea. Sin embargo, la diferencia en la respuesta serológica entre ambos grupos de animales vacunados no fue tan evidente como en el caso anterior.

(c) Por lo tanto, la vacuna Rev 1 administrada en animales jóvenes o adultos parece la medida profiláctica más adecuada y sencilla para el control de la infección en nuestro país. En aquellas ganaderías en las que las interferencias diagnósticas con B. melitensis sean un problema, la utilización de la vacunación conjuntival estaría recomendada.

5. El tratamiento combinado a base de Terramicina y Estreptomina resultó eficaz desde el punto de vista

bacteriológico en 11 de los 12 animales tratados. El tratamiento a base de Terramicina sola no fue eficaz.

Sin embargo, la efectividad del tratamiento desde el punto de vista microbiológico no quedó confirmada cuando se utilizaron criterios anatomopatológicos para valorarla.

6. BIBLIOGRAFIA

1. AFZAL M., TENDERDY R.P., ELLIS R.P., KIMBERLING C.V., MORRIS C.J., 1984. Protection of rams against epididymitis by a Brucella ovis vitamin E adyuvant vaccine. Veterinary Immunology and Immunopathology., 7: 293.
2. AFZAL M., TENDERDY R.P., SQUIRE P.G., ELLIS R.P., 1984. Characterization of B. ovis lipopolysaccharide and its use for diagnosis of ram epididymitis by enzyme-linked immunosorbent assay. Journal of Clinical Microbiology., 20: 1159.
3. AFZAL M., TENDERDY R.P., BRODIE S.J., DERMATINI J., ELLIS R.P., JONES R.L., KIMBERLING C.V., 1986. Immuneresponse in rams experimentaly infected with Brucella ovis. Research in Veterinary Science., 41: 85.
4. AJAI C.O., COOK J.E., DENNIS S.M., 1980. Diagnosing ovine epididymitis by immunofluorescence. Veterinary Record., 107: 421.
5. ALONSO B., 1986. Empleo de los polisacáridos hapténicos de Brucella melitensis en una prueba inmunoenzimática para el diagnóstico de la brucelosis bovina. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad de Navarra.
6. ALTON G.G., ELBERG S.S., 1967. Rev 1 Brucella melitensis vaccine. A review of ten years of study. The Veterinary Bulletin., 37: 793.
7. ALTON G.G., JONES L.M., PIETZ D.E., 1976. Las técnicas de laboratorio en la brucelosis. FAO/OMS. Serie monografias n.55, Edición 1976 (Ginebra, Suiza).
8. ALTON G.G., 1985. The epidemiology of B. melitensis in sheep and goats. En: Brucella melitensis. Verger and Plommet Ed.. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht/Boston/Lancaster. pp. 187-196.
9. ANONIMO 1983. The complement fixation test for the diagnosis of Brucella ovis infection of rams. An Animal Health Division Report. New Zealand Veterinary Journal., 31: 157.
10. BADIOLA J.J., BARBERAN M., GARCIA J.A., BASCUAS J.A., 1982. Características reproductivas de moruecos Romanov afectados de epididimitis

- infecciosa. III. Alteraciones anatomopatológicas. Anales del INIA / Serie Ganadera., 17: 69.
11. BAYNES I.D., SIMMONS G.C., 1960. Ovine epididymitis caused by Actinobacillus seminis. Australian Veterinary Journal., 36: 454.
 12. BAYNES I.D., SIMMONS G.C., 1968. Clinical and pathological studies of Border Leicester rams naturally infected with Actinobacillus seminis. Australian Veterinary Journal., 44: 339.
 13. BERMUDEZ J., BARRIOLA J., CUENCA L., RIET F., STOLOVAS A., 1980. Brucelosis ovina: estudio de un brote y esquema de control. Veterinaria Uruguay., 16: 31.
 14. BHONGBHIBHAT N., ELBERG S.S., CHEN T.H., 1970. Characterization of Brucella skin test antigens. Journal of Infectious Diseases., 122: 70.
 15. BIBERSTEIN E.L., MCGOWAN B., 1958. Epididymitis in rams. Studies on laboratory diagnosis. Cornell Veterinarian., 48: 31.
 16. BIBERSTEIN E.L., MCGOWAN B., ROBINSON E.A., HARROLD D.R., 1962. Epididymitis in rams. Studies on immunity. Cornell Veterinarian., 52: 214.
 17. BIBERSTEIN E.L., MCGOWAN B., OLANDER H., KENNEDY P.C., 1964. Epididymitis in rams. Studies on pathogenesis, Cornell Veterinarian., 54:27.
 18. BLASCO J.M., FOLCH J., BARBERAN M., 1982. Características reproductivas de moruecos Romanov afectados de epididimitis infecciosa. I. Observaciones clínicas y alteraciones de la fertilidad. Anales del INIA / Serie Ganadera., 15: 67.
 19. BLASCO J.M., DIAZ R., 1982. Epididimitis contagiosa del morueco. Aislamiento de B. ovis en España. Laboratorio, 73: 479.
 20. BLASCO J.M., 1983. La epididimitis contagiosa del morueco (infección por Brucella ovis). Revisión bibliográfica. Comunicaciones INIA / Serie de Higiene y Sanidad Animal., 5, 46pp.
 21. BLASCO J.M., MORIYON I., MARIN C., DIAZ R., 1985. Evaluation of a radial immunodiffusion test for differentiating infected from Rev - vaccinated sheep. En: Brucella melitensis. Verger and Plommet Ed., Martinus Nijhoff Publishers.

Dordrecht/Boston/Lancaster. pp.147-154.

22. BLASCO J.M. Contribución al estudio de la brucelosis ovina por Brucella ovis. Tesis doctoral, Facultad de Veterinaria. Zaragoza, España, 1986, 101pp.
23. BLASCO J.M., MARIN C.M., BARBERAN M., MORIYON I., DIAZ R. 1987. Immunization with Brucella melitensis Rev 1 against Brucella ovis infection of rams. Veterinary Microbiology, 14: 81.
24. BOGDAN J., 1960. A contribution to the etiopathogenesis of epididymitis tail nodes in rams. Folia Veterinaria, 4: 209.
25. BROWN G.M., RANGER C.R., KELLEY D.J., 1971. Selective media for the isolation of B. ovis. Cornell Veterinarian, 61: 265.
26. BRUERE A.N., WEST D.M., McLACHLAM N.I., EDWARDS J.D., CHAPMAN H.N., 1977. Genital infection of ram hoggets associated with a gram-negative pleomorphic organism. New Zealand Veterinary Journal, 25: 191.
27. BRUERE A.N., WEST D.M., 1987. Effectiveness of the New Zealand brucellosis control scheme for sheep. Proceedings of the N.Z. Society of Animal Production, 47: 49.
28. BRUNET J., 1978. Pasé, present et avenir de la prophylaxis de la brucellose. Patre, 225: 33
29. BUDDLE M.B., BOYES B.W., 1953. A brucella mutant causing genital disease of sheep in New Zealand and Australia. Australian Veterinary Journal, 29: 245.
30. BUDDLE M.B., 1954. Production of immunity against ovine brucellosis. New Zealand Veterinary Journal, 2: 99.
31. BUDDLE M.B., 1956. Studies on B. ovis as cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia. Journal of Hygiene, 54: 351.
32. BUDDLE M.B., 1957. Vaccination against Brucella ovis infection in sheep. New Zealand Veterinary Journal, 5: 43.
33. BUDDLE M.B. 1958. Vaccination in the control of Brucella ovis infection in sheep. New Zealand Veterinary Journal, 6: 41

34. BUDDLE M.B., 1962. Production of immunity in rams against B. ovis infection. New Zealand Veterinary Journal., 10: 111.
35. BUDDLE M.B., CALVERLEY F.K., BOYES B.W., 1963. Brucella ovis vaccination of rams. New Zealand Veterinary Journal., 11: 90.
36. BULGIN M.S., ANDERSON B.C., 1983. Association of sexual experience with isolation of various bacteria in cases of ovine epididymitis. Journal of the American Veterinary Medical Association., 182: 372.
37. BURGESS G.W., McDONALD J.W., 1981. Escherichia coli epididymitis and seminal vesiculitis in a ram. Australian Veterinary Journal., 57: 479.
38. BURGESS G.W., MORRIS M.J., 1982. Evaluation of the cold complement fixation test for diagnosis of ovine brucellosis. Australian Veterinary Journal., 59: 23.
39. CAMERON R.D., LAUERMAN L.H., 1976. Characteristics of semen changes during B. ovis infection in rams. Veterinary Record., 99: 231.
40. CHIN J.C., 1983. Comparison of different antigenic preparations for the detection of ovine serum antibodies against B. ovis by ELISA. Australian Veterinary Journal., 60: 261.
41. CLAPP K.H., 1955. A complement fixation test for the diagnosis of ovine brucellosis with special reference to epididymitis. Australian Veterinary Journal., 31: 27.
42. CLAPP K.H., 1962. A comparison of various antigens used in the complement fixation test for ovine brucellosis. Australian Veterinary Journal., 37: 188.
43. CLAXTON P.D., EVERETT R.E., 1966. Recovery of an organism resembling Histophilus ovis from a ram. Australian Veterinary Journal., 42: 457.
44. CLAXTON P.D., 1968. B. ovis vaccination of rams. A comparison of two commercial vaccines and two methods of vaccination. Australian Veterinary Journal., 44: 48-54.
45. COLLINS F.M., CAMPBELL S.G., 1982. Immunity to intracellular bacteria, Veterinary Immunology



Immunopathology., 3: 5.

46. COX J.C., GORRIE C.J., NAIRN R.C., WARD H.A., 1977. A comparison of methods for the serological diagnosis of B. ovis infection. British Veterinary Journal., 133: 442.
47. DELONG W.J., WALDHALM D.G., HALL R.F., 1979. Bacterial isolates associated with epididymitis in rams from Idaho and eastern Oregon flocks. American Journal of Veterinary Research., 40: 101.
48. DIAZ R., JONES L.M., WILSON J.B., 1967. Antigenic relationship of B. ovis and B. melitensis. Journal of Bacteriology., 93: 1262.
49. DIAZ R., JONES L.M., LEONG D., WILSON J.B., 1968. Surface antigens of smooth Brucellae. Journal of Bacteriology., 96: 893.
50. DIAZ R., JONES L.M., WILSON J.B., 1968. Antigenic relationship of the gram-negative organism causing canine abortion to smooth and rough Brucellae. Journal of Bacteriology., 95: 618.
51. DIAZ R., 1972. Importance de la réaction de précipitation sur gélose dans le diagnostic de la brucellose. Ouest medicale., 25: 967.
52. DIAZ R., BOSSERAY N., 1973. Identification d'un composé antigenique spécifique de la phase rugueuse des Brucella. Annales de Recherches Veterinaires., 4: 283.
53. DIAZ R., 1974. Valoración de la prueba del Rosa de Bengala y la demostración de anticuerpos antiproteína de Brucella en el diagnóstico serológico de brucelosis y yersiniosis. Medicina clínica., 63: 463
54. DIAZ R., MARAVI-POMA E., RIVERO A., 1976. Comparison of counterimmunoelectrophoresis with other serological tests in the diagnosis of human brucellosis. Bulletin of the World Health Organization., 55: 417.
55. DIAZ R., MARAVI-POMA E., DELGADO G., RIVERO A. 1978. Rose bengal plate agglutination and counterimmunoelectrophoresis test on spinal fluid in the diagnosis of Brucella meningitis. Journal of Clinical Microbiology., 4: 236
56. DIAZ R., GARATEA P., JONES L.M., MORIYON I., 1979.

- Radial immunodiffusion test with a brucella polysaccharide antigen for differentiating infected from vaccinated cattle. Journal of Clinical Microbiology., 10: 37.
57. DIAZ R., ITOIZ A.I., DORRONSORO I., SALVO M.D., PARDO M.L., 1980. Aplicación de la técnica de coaglutinación para la identificación de microorganismos pertenecientes al género Brucella y de los aglutinógenos A y M. Laboratorio, 70: 509.
58. DIAZ R., TOYOS J., SALVO M.D., FERNANDEZ L., ALONSO B., MORIYON I., DORRONSORO I., 1984. Studies on the polysaccharide B and native haptene of Brucella and Y. enterocolitica serotype 9. Developements in Biological Standardization., 56: 213.
59. DOLLEY P., GERAL M.F., PELLERIN J.L., MILON A., LAUTIE R., 1982. L'epididymite contagieuse du bélier (infection à B. ovis). Note 1: Mise au point de trois méthodes de diagnostic serologique. Recueil de Medicine Veterinaire., 133: 187.
60. DOUGLAS J.T., ROSENBER E.Y., NIKARDO H., WESTREATE D.R., WINTER A.J., 1984. Porins of Brucella species. Infection and Immunity., 44: 37.
61. DUBRAY G., PLOMMET M., 1976. Structure et constituants des Brucella. Caractérisation des fractions et propriétés biologiques. Developements in Biological Standardization., 31: 68.
62. EDKALL M.O., MONEY D.F., MARTIN C.A., 1968. Some aspects of epididymitis in rams in New Zealand. New Zealand Veterinary Journal., 16: 81.
63. ELBERG S.S., FAUNCE K., 1957. Immunization against Brucella infection. VI. Immunity conferred on goats by a non dependent mutant strain of B. melitensis. Journal of Bacteriology., 73: 211.
64. ELBERG S.S., 1981. Rev 1 Brucella melitensis Part II 1968-1980, The Veterinary Bulletin., 51:67.
65. EL WISHY A.B., KHATER A.R., EL SAWAF F.A., MOUSTAFA A.S., 1975. Reproductive disorders caused by Corynebacterium ovis in imported Merino rams. Veterinary Medicine Journal., 23: 189.
66. ERASMUS J.A., BERGH E.C., 1985. Ovine brucellosis: repeated vaccination with Rev 1 vaccine and thr prevalence of the disease in the

Winburg district. Journal of the South African Veterinary Association., 56: 205

67. EUGSTER A.K., BALL L., CARROLL E.J., STORZ J., 1970. Experimental genital infection of bulls and rams with Chlamydial agents. Proc. 6th Int. Meet. Dis. Cattle, pp.327.
68. FARRELL I.D., 1974. The development of a new selective medium for the isolation of B. abortus from contaminated sources. Research in Veterinary Science., 16: 280.
69. FENSTERBANK R., PARDON P., MARLY J., 1982. Efficacy of B. melitensis Rev 1 vaccine against B. ovis infection in rams. Annales de Recherches Veterinaires., 13: 185.
70. FENSTERBANK R., PARDON P., MARLY J., 1982. Comparison between subcutaneous and conjunctival route of vaccination with Rev 1 strain against Brucella melitensis infection in ewes. Annales de Recherches Veterinaires., 13: 295.
71. FENSTERBANK R., 1985. Allergic diagnosis of Brucellosis in Brucella melitensis. Plommet M. and Verger J.M. Eds., Martinus Nijhoff Publ., Dordrechht, Boston, Lancaster, p.167.
72. FENSTERBANK R., PARDON P., MARLY J., 1985. Vaccination of ewes by a single conjunctival administration on Brucella melitensis Rev 1 vaccine. Annales de Recherches Veterinaires., 16: 351.
73. FOLCH J., BLASCO J.M., URIARTE J., 1981. Características reproductivas de moruecos Romanov afectados de epididimitis infecciosa. II. Alteraciones seminales. Anales del INIA / Serie Ganadera., 15: 77.
74. GALANOS C., LUDERITZ O., WESTPHAL O., 1969. A new method for the extraction of R lipopolysaccharides. European Journal of Biochemistry., 9: 245.
75. GALANOS C., RIETSCHEL E.T., LÜDERITZ O., WESTPHAL O. 1972. Biological activities of lipid A complexed with bovine serum albumin. European Journal of Biochemistry., 31: 230.
76. GARCIA-CARRILLO C., 1981. Protection of rams against B. ovis infection by B. melitensis Rev 1 vaccine. Zentralblatt fur Veterinary Medicin B,

28: 425.

77. GELABERT J.L., JUSTE R.A., SAEZ DE OCARIZ C., BASCONES M., 1985 Leucosis enzootica bovina: incidencia en el ganado vacuno del país vasco y estudio de una explotación afectada. ITEA Volumen Extra., 5: 434.
78. GIAUFFRET A., SANCHIS R., 1974. Etude d'un foyer d'epididymite contagieuse du bélier. Erradication de la maladie. Bulletin de l'Office International des Epizooties., 82: 581.
79. GOMEZ-MIGUEL M.J., MORIYON I. 1986. Demonstration of a peptidoglycan-linked lipoprotein and characterization of its trypsin fragment in the outer membrane of Brucella spp. Infection and Immunity., 53: 678.
80. GOMEZ-MIGUEL M.J., MORIYON I., LOPEZ J. 1987. Brucella outer membrane lipoprotein shares antigenic determinants with Escherichia coli Braun lipoprotein and is exposed on the cell surface. Infection and Immunity., 55:258.
81. GRADWELL D.V., VAN ZYLL F.E., 1975. Effectivity of Rev 1 vaccine in rams against B. ovis infection. Journal of the South African Veterinary Association., 46: 349.
82. GUERRA M.A., NICOLETTI P., 1986. Comparison of the susceptibility of Brucella abortus isolates obtained before and after cows were treated with oxytetracycline and streptomycin. American Journal of Veterinary Research., 47: 2612.
83. GUTIERREZ J.C. 1985. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad de Navarra.
84. HALL W.H. 1983. Human brucellosis. In: Current therapy in infectious diseases 1983-1984, Kas EM, Platt R eds., Philadelphia, Decker, pp 23.
85. HARDEFELDT K.W., 1977. Field investigations into the diagnosis of some infectious causes of epididymitis in rams. Victorian Veterinary Proceedings., 35: 28.
86. HARTLEY W.J., JEBSON J.L., McFARLANE D., 1955. Some observations on natural transmission of ovine brucellosis. New Zealand Veterinary Journal., 3: 5.
87. HAUGHEY K.G., HUGHES K.L., 1969. The apparent

- failure of a vaccine to protect rams against naturally occurring B. ovis infection. Australian Veterinary Journal., 45: 10.
88. HUGHES K.L., CLAXTON P.D., 1968. B. ovis infection. Australian Veterinary Journal., 44: 41.
 89. JAMIESON S., SOLTYS M.A., 1947. Orchiepididymitis in rams due to Pasteurella pseudotuberculosis. Veterinary Record., 59: 351.
 90. JANSEN B.C., 1980. The etiology of ram epididymitis. Onderstepoort Journal of Veterinary Research., 47: 101-107.
 91. JONES L.M., DIAZ R., TAYLOR A.G., 1973. Characterization of allergens prepared from smooth and rough strains of B. melitensis. British Journal of Experimental Pathology., 54: 492.
 92. JONES L.M., 1974 Specificity of Brucella protein antigen and role of lipopolysaccharide antigens in eliciting delayed hypersensitivity reactions in sensitized guinea pigs. Annales de Recherches Veterinaires., 5: 199.
 93. JONES L.M., MARLY J., 1975. Titration of a Brucella protein antigen in sheep sensitized with Brucella melitensis. Annales de Recherches Veterinaires., 6: 11.
 94. JONES L.M., DUBRAY G., MARLY J., 1975. Comparison of methods of diagnosis of B. ovis infection of rams. Annales de Recherches Veterinaires., 6: 11.
 95. JUBB K.V., KENNEDY P.C., 1974. Patología de los animales domésticos. Tomo I. Ed. Labor. (Barcelona).
 96. KADAR I., BANFALVI E., 1979. Isolation of B. ovis from aborted sheep fetuses and serological methods to detect infection of ewes and rams. Magyar Allatorvosok Lapja, 34: 542.
 97. KATER J.C., HARTLEY W.J., 1963. Lameness in rams following vaccination against B. ovis infection. New Zealand Veterinary Journal., 11: 65.
 98. KENNEDY P.C., FRAZIER L.M., MCGOWAN B., 1956. Epididymitis in rams. Pathology and bacteriology. Cornell Veterinarian., 46: 303.

99. KULSHRESHTHA R.C., KALRA D.S., 1978. A study on sheep brucellosis with particular reference to infectious epididymitis outbreak in rams. Indian Veterinary Journal., 55: 357.
100. KUPPUSWAMY P.B., 1954. Chemotherapy of brucellosis in rams. New Zealand Veterinary Journal., 2: 110
101. LAMB V.L., JONES L.M., SCHURIG G.G., BERMAN D.T., 1979. Enzyme linked immunosorbent assay for bovine immunoglobulin subclass-specific response to Brucella abortus lipopolysaccharide. Infection and Immunity., 26:240.
102. LANTIER F., FENSTERBANK R., 1985. Kinetics of Rev 1 infection in sheep. En: Brucella melitensis. Verger and Plommet ed., Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht/Boston/Lancaster. p.247.
103. LAWRENCE W.E., 1961. Ovine brucellosis. A review of the disease in sheep manifested by epididymitis and abortion. British Veterinary Journal., 117: 435.
104. LEONG D., DIAZ R., MILNER K., RUBDACH J., WILSON J.B., 1970. Some structural and biological properties of Brucella endotoxin. Infection and Immunity., 1: 174.
105. LIBAL M.C., KIRKBRIDE C.A., 1983. B. ovis induced abortion in ewes. Journal of the American Veterinary Medical Association., 183: 553.
106. LIVINGSTONE C.H., HARDY W.T., 1964. Isolation of Actinobacillus seminis from ovine epididymitis. American Journal of Veterinary Research., 25: 660.
107. LOWRY O.M., ROSEBROUGH M.J., FARR A.L., RANDALL R.J., 1951. Protein measurement by folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry., 193: 265.
108. McDIARMID J.J., 1978. Observations on B. ovis CFT results. New Zealand Veterinary Journal., 26: 286.
109. MCGOWAN B., 1979. Epididymitis in rams: effect of vaccination and culling on the clinical incidence of the disease. Cornell Veterinarian., 69: 67.
110. MCGOWAN B., HARROLD D.R., 1979. Epididymitis in

- rams. Studies on vaccine efficacy. Cornell Veterinarian., 69: 73.
111. MEINERSHAGEN W.A., FRANK F.W., WALDHALM D.G., 1974. B. ovis as cause of abortion in ewes. American Journal of Veterinary Research., 35: 723.
112. MILWARD F.W., NICOLETTI P., HOFFMANN E., 1984. Effectiveness of various therapeutic regimes for bovine brucellosis. American Journal of Veterinary Research., 45: 1825.
113. MORENO E., PITT M.W., JONES L.M., SCHURIG G.C., BERMAN D.T., 1979. Purification and characterization of smooth and rough lipopolysaccharides from Brucella abortus. Journal of Bacteriology., 138: 361.
114. MORENO E., 1980. Purification, chemical characterization and biological activity of Brucella lipopolysaccharide. PhD Thesis. University of Wisconsin, Madison. 169 pp.
115. MORENO E., SPETH S.L., JONES L.M., BERMAN D.T., 1981. Immunochemical characterization of Brucella polysaccharides and lipopolysaccharides. Infection and Immunity., 31: 214.
116. MORENO E., JONES L.M., BERMAN D.T., 1984. Immunochemical characterization of rough Brucella lipopolysaccharides. Infection and Immunity., 43: 779.
117. MORIYON I., BERMAN D.T., 1982. Effect of nonionic ionic and dipolar ionic detergents and EDTA on the Brucella cell envelope. Journal of Bacteriology., 152:822.
118. MORIYON I., BERMAN D.T., 1983. Isolation, purification and partial characterization of Brucella abortus matrix protein. Infection and Immunity. 39: 394.
119. MORIYON I., 1986. Estructura antigénica del género Brucella. Bovis., 9: 39.
120. MURRAY R.M., 1969. Scrotal abnormalities in rams in tropical Queensland with particular reference to ovine brucellosis and its control. Australian Veterinary Journal., 45: 63.
121. MYERS D.M., SINIUK A.A., 1970. Preliminary report on the development of a diffusion in gel method

- for the diagnosis of ram epididymitis. Applied Microbiology., 19: 335.
122. MYERS D.M., JONES L.M., VARELA-DIAZ V.M., 1972. Studies of antigens for complement fixation and gel diffusion tests in the diagnosis of infections caused by B. ovis and other Brucella. Applied Microbiology., 23: 894.
123. MYERS D.M., 1973. Field evaluation of the gel diffusion test for the diagnosis of ram epididymitis caused by B. ovis. Applied Microbiology., 26: 855.
124. MYERS D.M., VARELA-DIAZ V., 1979. Serodiagnosis of ram epididymitis by counterimmunoelectrophoresis using B. ovis surface R antigen. Journal of Clinical Microbiology., 10: 451.
125. NICOLETTI P., MILWARD F.W., HOFMANN E., 1985. Efficacy of long-acting oxytetracycline alone or combined with streptomycin in the treatment of bovine brucellosis. Journal of American Veterinary Medical Association., 187: 493.
126. O'HARA P.J., WEDDEL W., 1979. What use is the B. ovis complement fixation test?. New Zealand Veterinary Association. Sheep Society. Seminar 1979. pp. 39-44.
127. ORLOV E.S., KASYANOV A.N., KOV A.A., ROMKHOV V.A. 1976. Stability of the ovine infectious epididymitis agent. Trudy Vseso. Inst. Eks. Veterinar., 44: 55.
128. OUCHTERLONY O., 1949. Antigen-antibody reactions in gels. Acta of pathologica microbiologica Scandinavica., 26: 507.
129. RAHALEY R.S., DENNIS S.M., SMELTZER M.S., 1983. Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay and complement fixation test for detecting B. ovis antibodies in sheep. Veterinary Record., 113: 467.
130. RICHARSON M., HOLT J.N., 1962. Synergistic action of streptomycin with other antibiotics on intracellular Brucella abortus in vitro. Journal of Bacteriology., 84: 638.
131. RIEZU-BOJ J.I., MORIYON I., BLASCO J.M., MARIN C., DIAZ R., 1986. Comparison of lipopolysaccharide and outer membrane

- protein-lipopolysaccharide extracts in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of B. ovis infection. Journal of Clinical microbiology., 23: 938.
132. RIEZU-BOJ J.I., MORIYON I., BLASCO J.M. 1988. Comunicación personal, resultados no publicados.
133. RIS D.R., TE PUNGA W.A., 1963. An indirect haemagglutination test for the detection of B. ovis antibodies.I. Development of the test. New Zealand Veterinary Journal., 11: 94.
134. RIS D.R., 1964. An indirect haemagglutination test for the detection of B. ovis antibodies.II. Comparison of the indirect haemagglutination test with other methods. New Zealand Veterinary Journal., 12: 72.
135. RIS D.R., 1967. The persistence of antibodies against B. ovis and B. abortus in rams following vaccination: a field study. New Zealand Veterinary Journal., 15: 94.
136. RIS D.R., 1974. The complement fixation test for the diagnosis of B. ovis infection in sheep. New Zealand Veterinary Journal., 22: 143.
137. RIS D.R., HAMEL K.L., LONG D.L., 1984. Comparison of an enzyme-linked immunospecific assay with the cold complement fixation test for the serodiagnosis of B. ovis infection. New Zealand Veterinary Journal., 32: 18.
138. RODOLAKIS A., BERNARD K., 1977. Isolation of Chlamydia from the genital of rams affected by clinical epididymitis. Bulletin de l'Académie Veterinaire de France., 50: 65.
139. RODRIGUEZ A.A., DUCHA J., RAMIS M., LARA C., LATRE M.V., GONZALEZ J. 1981. Estudio microbiológico de la microflora bacteriana aislada del aparato reproductor y semen de carneros afectados de orquitis y epididimitis. Libro homenaje al profesor Dr. D. Angel Sanchez Franco. Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza.
140. SANCHIS R., GIAUFFRET A., 1976. Mise au point d'une microtechnique de fixation du complement appliquée au serodiagnostics de l'epididymite contagieuse du bélier. Recueil de Médecine Veterinaire., 152: 305.
141. SANTOS J.M., VERSTREATE D.R., PERERA V.Y., WINTER

- A.J., 1984. Outer membrane proteins from rough strains of four Brucella species. Infection and Immunity., 46: 188.
142. SEARSON J.E., 1982. Sensitivity and specificity of two microtitre complement fixation tests for the diagnosis of Brucella ovis infection in rams. Australian Veterinary Journal., 58: 5.
143. SHORTRIDGE E.H., 1962. Lesions of the testicle and epididymis of rams. New Zealand Veterinary Journal., 10: 23.
144. SIMMONS G.C., HALL W.T., 1953. Epididymitis of rams. Australian Veterinary Journal., 29: 33.
145. SIMMONS G.C., BAYNES I.D., LUDFORD C.G., 1966. Epidemiology of Actinobacillus seminis in flocks of Border Leicester sheep. Australian Veterinary Journal., 42: 183.
146. SPENCER T.L., BURGESS G.W., 1984. Enzyme-linked immunosorbent assay for B. ovis specific antibody in ram sera. Research in Veterinary Science., 36: 194.
147. STORZ J., CARROLL E.J., STEPHENSON E.M., BALL L., EUGSTER A.K., 1976. Urogenital infection and seminal excretion after inoculation of bulls and rams with Chlamydia. American Journal of Veterinary Research., 37: 517.
148. SWIFT B.L., MAKI L.R., 1968. Immunological studies on three ram epididymitis bacterins. Cornell Veterinarian., 58: 659.
149. THAYER J.D., MARTIN J.E., 1964. A selective medium for the cultivating of N. gonorrhoeae and N. meningitidis. Publ. Health Dpt. U.S., 79: 49.
150. THIELE O.W., BUSSE D., HOFFMANN K., 1968. Die "freien" lipide ans Brucella abortus Bang. 4. Die Natur der phosphatide un ihre Fettsaurezusammenstzung. European Journal of Biochemistry., 5: 513.
151. TRAP D., GAUMONT R., 1982. Comparaison entre électrosynérèse et épreuves serologiques classiques dans le diagnostic de la brucellose ovine. Annales de Recherches Veterinaires., 13: 33.
152. THORMS C.J., MORRIS J.A. 1986. Shared epitopes between mycobacteria and other microorganisms.

- Research in Veterinary Science., 41: 275.
153. VAN DRIMMELEN G.C., BOTHEs H.J., CLAASSEN N., ROSS W.F., VILJOEN C.C., 1963. The use of fluorescent antibody in the diagnosis of Brucella ovigenitalium infection in sheep semen smears. Journal of The South African Veterinary Association., 34: 265.
 154. VAN HEERDEN K.M., VAN RENSBURG S.W., 1962. The immunization of rams against ovine brucellosis. Journal of The South African Veterinary Association., 33: 143.
 155. VAN TONDER E.M., BOLTON T.F., 1968. Epididymitis in rams caused by Actinobacillus seminis. Journal of The South African Veterinary Association., 39: 87.
 156. VAN TONDER E.M., 1973. Infection of rams with A. seminis. Journal of The South African Veterinary Association., 44: 235.
 157. VERSTREATE D.R., CREASY M.T., CAVENEY M.T., BALDWIN C.L., BLAB M.W., WINTER A.J., 1982. Outer membrane proteins of B. abortus: isolation and characterization. Infection and Immunity., 35: 979.
 158. WALKER R.L., LEAMASTER B.R., STELLFLUG J.N., BIBERSTEIN E.L., 1985. Use of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to B. ovis in sheep: field trial. American Journal of Veterinary Research., 46: 1642.
 159. WARREN L., 1959. The thiobarbituric acid assay of sialic acids. Journal of Biological Chemistry., 234: 1971.
 160. WATT D.A., 1972. Testicular abnormalities and spermatogenesis of the ovine and other species. Veterinary Bulletin., 42: 181.
 161. WEBB R.F., QUINN C.A., COCKRAM F.A., HUSBAND A.J., 1980. Evaluation of procedures for the diagnosis of B. ovis infection in rams. Australian Veterinary Journal., 56: 172.
 162. WEBB R.F., 1983. Clinical findings and pathological changes in Histophilus ovis infections of sheep. Research in Veterinary Science., 35: 30.

163. WEDDEL W., 1974. An automated complement fixation test for B. ovis in sheep. New Zealand Veterinary Journal., 22: 1.
164. WEST D.M., 1978. The control of ovine brucellosis. Proceedings 8th Seminar of the N.Z. Veterinary Society., p.45.
165. WEST D.M., JOHNSTONE A.C., BRUERE A.N., CHAPMAN H.N., 1978. Epiphysitis in rams following vaccination against B. ovis infection. New Zealand Veterinary Journal., 26: 133.
166. WEST D.M., BRUERE A.M., 1979. Accreditation for freedom from ovine brucellosis. New Zealand Veterinary Journal., 27: 263.
167. WEST D.M., BRUERE A.N., 1983. The Brucella ovis complement fixation test. New Zealand Veterinary Journal., 31: 124.
168. WESTPHAL O. LÜDERITZ, BISTER O., 1952. Über die extraktion von bacterien mit phenol / wash. Z. Naturf., 7: 148.
169. WILLIAMSON P., NAIRN M.E., 1980. Lesions caused by Corynebacterium pseudotuberculosis in the scrotum of rams. Australian Veterinary Journal., 56: 496.
170. WORTHINGTON R.W., BOSMAN P.P., 1968. Isolation of A. seminis in South Africa. Journal of The South African Veterinary Association., 39: 81.
171. WORTHINGTON R.W., MULDER M., 1969. Antigenic relationship of B. ovis to B. abortus and B. melitensis using the complement fixation test. Onderstepoort Journal of Veterinary Research., 36: 191.
172. WORTHINGTON R.W., WEDDEL W., PENROSE M.E., 1984. A comparison of three serological tests for the diagnosis of B. ovis infection in rams. New Zealand Veterinary Journal., 32: 58.
173. WORTHINGTON R.W., STEVENSON D.J., DELISLE G.W., 1985. Serology and semen culture for the diagnosis of B. ovis infection in chronically infected rams. New Zealand Veterinary Journal., 33: 84.
174. ZAMORA J., REINHARDT G., ROJAS X., 1971. Epididimitis de los carneros. II. Frecuencia y etiología de la enfermedad en el sur de Chile.

Archivos de Medicina Veterinaria., 3: 75.

175. ZAMORA J., CHAUAN E., POLETTE M., ALONSO O., ROJAS X., KRUCÉ J., HERVE M., 1977. B. ovis y otros agentes etiológicos en epididimitis y orquitis infecciosa ovina. Archivos de Medicina Veterinaria., 9: 94.

Fe de erratas

- Página ABREVIATURAS, línea 2: donde pone saltz debería poner salt.
- Página ABREVIATURAS, debería incluirse: 5-AS: Acido 5-amino-hidroxibenzoico.
- Página 2 del RESUMEN, línea 22: donde pone Rev ' debería poner Rev 1.
- Página 1 del SUMMARY, línea 9: donde pone saltz debería poner salt.
- Página 1 del SUMMARY, línea 14: donde pone sustrates debería poner substrates.
- Página 2 del SUMMARY, línea 13: donde pone profylaxis debería poner prophylaxis.
- Página 3 del SUMMARY, línea 17: donde pone isolati6n debería poner isolation.
- Página 3 del SUMMARY, línea 24: donde pone inoculations vaccine debería poner inoculations.
- Página 4 del SUMMARY, línea 2: donde pone ion with debería poner with.
- Página 4 del SUMMARY, línea 6: donde pone Terramycine debería poner Terramycin.
- Página 1, línea 6: donde pone 19 debería poner 18, 19.
- Página 7, línea 8: donde pone 168 debería poner 157.
- Página 9, línea 4: donde pone 56 debería poner 56, 58.
- Página 9, línea 17: donde pone 58, 115 debería poner 115, 116.
- Página 10, línea 7: donde pone 134 debería poner 114.
- Página 12, línea 13: donde pone 124 debería poner 121.
- Página 13, línea 4: donde pone anteriormente (3, 131) debería poner anteriormente.
- Página 14, línea 10: donde pone 71, 92, 94 debería poner 71, 92, 93, 94.
- Página 15, línea 15: donde pone 21 debería poner 12.
- Página 15, línea 16: donde pone 65, 89 debería poner 65, 73, 89.
- Página 15, línea 17: donde pone 145, 153, 155 debería poner 145, 155.
- Página 17, línea 20: donde pone 157 debería poner 134.
- Página 17, línea 22: donde pone 123 debería poner 122, 123.
- Página 19, línea 24: donde pone 166, 161 debería poner 161, 166.
- Página 21, línea 4: donde pone 94 debería poner 93.
- Página 22, líneas 4 y 12: donde pone 150 debería poner 158.
- Página 22, línea 5: donde pone 108 debería poner 40.
- Página 22, línea 11: donde pone saltz debería poner salt.
- Página 24, línea 17: donde pone 149 debería poner 148.
- Página 26, línea 17: donde pone protecci6n elevadísimos debería poner protecci6n.
- Página 43, línea 20: donde pone saltz debería poner salt
- Página 110, línea 9: donde pone 131, 22 debería poner 22, 131.
- Página 111, líneas 10 y 12: donde pone 131, 22 debería poner 22, 131.
- Página 114, líneas 9 y 10: donde pone 88, 101, 149 debería poner 101.
- Página 117, línea 15: donde pone 73 debería poner 173.
- Página 118, línea 2: donde pone 131, 22 debería poner 22, 131.
- Página 132, línea 38: donde pone sananidad debería poner sanidad.