BRUCELOSIS OVINA POR *Brucella ovis*

J.M. Blasco[1] y M. Barberán [1]

INTRODUCCION

La clasificación actual del género Brucella reconoce seis especies: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* y *B. neotomae*. Pese a que *B. abortus* (parásita habitual del ganado bovino) ha sido aislada como responsable de brotes epizoóticos en ganado ovino (1), y *B. suis* puede, en teoría, afectar al ganado ovino, la responsabilidad de la brucelosis ovina corresponde casi exclusivamente a *B. melitensis* y a *B. ovis*. Aunque ambas especies pueden producir abortos y alteraciones testiculares, *B. ovis* parece poseer un tropismo especial por el morueco, en el que produce un cuadro característico que se denomina Epididimitis infecciosa. Por otra parte, *B. melitensis* es la principal responsable de la brucelosis humana, particularmente en algunos paises de la cuenca Mediterránea, Africa, Asia y Sudamérica.

Debido a que la infección por *B. melitensis* no ha sido descrita en Uruguay y que el problema de brucelosis ovina en este país se debe a la infección por *B. ovis*, centraré exclusivamente mi exposición en la descripción de este proceso infeccioso.

Aunque la importancia económica de esta infección es objeto de una viva y permanente controversia, nuestra opinión personal es que las pérdidas económicas que provoca en la explotación ovina garantizan el exito económico de cualquier campaña de control frente a la misma, siempre y cuando se haga con el debido rigor. Otra cuestión bien diferente reside en quién habra de costear dicha campaña, si la administración o bien los productores. La realidad parece demostrar que, salvo contadas excepciones (como Australia y Nueva Zelanda), la administración pública tiene poco interés en controlar esta infección, debido sobre todo a que no se trata de una zoonosis. En consecuencia, es el sector productor quien deberá decidir el futuro de las campañas de control frente a esta enfermedad.

DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO

La infección por *B. ovis* puede diagnosticarse presuntivamente mediante el examen microscópico rápido de frotis de semen o bien de escobillones vaginales, de placenta, o de fetos abortados. Los frotis pueden colorearse por los procedimientos de Gram, Koster o Stamp (2). La coloración de Stamp es la más utilizada y con ella, *B. ovis* aparecen teñidas de rojo presentando una morfología cocoide o cocobacilar. Un técnico experimentado puede realizar este tipo de diagnóstico con una cierta garantía, siempre de una forma presuntiva, debiendo confirmarlo mediante el aislamiento bacteriológico. El aislamiento de *B. ovis* sobre un medio de cultivo y su correcta identificación, es la única prueba incontestable de la existencia de una brucelosis en un determinado animal. La utilización de muestras correctas y la disponibilidad de medios selectivos adecuados permiten realizar el diagnóstico bacteriológico con garantía en la mayor parte de los casos.

---

[1] DMV, Ph.D. Dpt. Sanidad Animal. SIA/DGA. Ap727. 50080 Zaragoza. España.
Teléfono 76 576336 Fax: 76 575501 Telex 58194 IDAE E

Para el aislamiento de *B. ovis* las muestras más recomendables son el esperma recogido en bolsas de plástico tras la electroeyaculación o bien los escobillones tomados de la cavidad prepucial tras la electroeyaculación o bien de la vagina de ovejas, inmediatamente después de la cubrición natural Las muestras más idóneas para aislar *B. ovis* tras la necropsia de los carneros infectados son el epidídimo, vesículas seminales, ampollas del conducto deferente, ganglios linfáticos (iliacos, escrotales, escapulares, crurales, parotídeos, submaxilares y retrofaríngeos) y bazo (3). El aislamiento de *B. ovis* puede realizarse también tras la autopsia de las ovejas infectadas, siendo las muestras más adecuadas la leche, el útero, los ganglios linfáticos (iliacos, supramamarios, crurales, parotídeos, submaxilares y retrofaríngeos) y el bazo. Aunque la infección por *B. ovis* no se ha demostrado nunca en la especie humana, la utilización de guantes es la precaución mínima que debe adoptarse y lo más recomendable es trabajar siempre en una cabina de flujo laminar vertical. Para el aislamiento de *B. ovis* lo más recomendable es que la siembra se realice lo antes posible desde la recogida de la muestra y se evite en lo posible la congelación de las mismas como procedimiento de conservación.

B. ovis es una bacteria serófila estricta (excepto algunas cepas), por lo que para su aislamiento requiere que el medio de cultivo posea de un 5 a 10 % de sangre o suero (o un 2% de hemoglobina) Además, requiere una atmósfera con alrededor del 10 % de CO2 para crecer (aunque pueden aislarse mutantes CO2-independientes). Los medios ordinarios del tipo Blood agar base nº 2 o GC medium base, conteniendo un 5-10% de sangre o suero, son particularmente adecuados para el aislamiento de *B. ovis*. La utilización de estos medios de cultivo no puede recomendarse para el aislamiento primario debido a la gran contaminación que suelen tener todas las muestras por bacterias de crecimiento rápido (cocos gram positivos y enterobacterias, fundamentalmente) que pueden impedir el desarrollo de *B. ovis*, bacteria de tiempo de generación mucho mas lento Afortunadamente, disponemos de medios selectivos que, aún partiendo de muestras contaminadas, permiten el aislamiento de *B. ovis* con bastante fiabilidad. El medio selectivo mas utilizado para el aislamiento de Brucellae es el de Farrell (4), pero este medio posee la peculiaridad de inhibir el crecimiento de *B. ovis*. Para el aislamiento de *B. ovis* el medio selectivo (semiselectivo, en realidad) más adecuado es el de Thayer-Martin modificado (5), que suele prepararse con medio GC base conteniendo un 2% de hemoglobina y Vancomicina, Colistina, Nistatina y Nitrofurantoina como inhibidores antibióticos.

Puesto que no existe un criterio único, para la identificación de una bacteria como *B. ovis* deben tenerse presentes un conjunto de caracteres considerados colectivamente. Las colonias en aislamiento primario sobre medios selectivos no suelen ser visibles hasta los 3-5 días de incubación y poseen una morfología rugosa estable. *Brucella ovis* es una bacteria gramnegativa de morfología cocoide o cocobacilar (0,7-1,2 μ de largo x 0,5-0,7 μ de ancho), no esporulada, no flagelada ni capsulada. Su carácter de ligera ácido-alcohol resistencia permite su tinción por el método de Stamp (2). Son bacterias inmóviles y suelen presentarse en los frotis en forma aislada. Son catalasa positivo, no producen hemólisis en agar sangre y son negativas en las pruebas del Indol, Citrato, Rojo Metilo y Voges-Proskauer. Ante un crecimiento característico sobre el medio selectivo (morfología colonial y Gram), una aglutinación positiva con Acriflavina (2) y un resultado negativo en las pruebas de oxidasa y ureasa son suficientes para garantizar un diagnóstico casi certero de *B. ovis*, aunque lo más conveniente para una tipificación final es enviar las cepas aisladas a un laboratorio especializado, en el que; entre otras, pueda realizarse la pueba de sensibilidad al fago R/C (2,3).

EPIDEMIOLOGIA

El término epidemiología puede tener diversas interpretaciones en Medicina Veterinaria, pero su uso mas general es el relativo al estudio de la medicina de la población. Aquí trataremos de resumir los factores que pueden contribuir a la presencia y persistencia de la infección por *B. ovis* en las poblaciones ovinas.

Al igual que ocurre con la mayor parte de las enfermedades infecciosas, esta infección suele aparecer en un rebaño por primera vez tras la compra de animales infectados. En consecuencia, el riesgo de padecerla disminuye considerablemente en las explotaciones de ciclo cerrado Desafortunadamente, en la inmensa mayoría de las explotaciones de ganado ovino, por lo menos en España, se realizan grandes trasiegos de animales (compras de reposición, préstamos de sementales, etc), lo que facilita la diseminación de la infección y dificulta extraordinariamente su control.

Existen multitud de referencias bibliográficas sobre los mecanismos de transmisión de *B. ovis* de los animales infectados a los sanos. La inmensa mayoría estan de acuerdo en que la transmision venérea pasiva a través de la oveja es la principal vía de contagio (3). En condiciones naturales una misma oveja suele ser repetidamente cubierta por varios carneros, lo que facilita la diseminacion de la infección. Esta transmisión venérea pasiva a través de la oveja en la época de cubrición debe considerarse como la más importante para la difusión de la infección, al menos en sistemas de explotación en los que la inmensa mayoría de ganaderos realizan una cubrición continuada.

La transmisión directa de morueco a morueco también se da con frecuencia, particularmente en aquellos sistemas de explotación con cubriciones controladas, en los que los carneros se someten a periodos de estabulación prolongada en recintos poco espaciosos. En estas condiciones, los carneros establecen jerarquías de dominancia caracterizadas por un acusado comportamiento homosexual. Una vez establecidas, los carneros dominantes montan a los carneros sometidos, pudiendo transmitir *B. ovis* a través de la mucosa rectal. Sin embargo, es a través de la vía oral como se producen la mayor parte de los contagios de carnero a carnero durante la estabulación. Ello se debe al comportamiento homosexual de estos animales en los periodos de estabulación prolongada, durante los cuales se lamen el prepucio unos a otros, y puesto que los carneros infectados excretan millones de bacterias por el semen y por las secreciones genitales, es frecuente que presenten *B. ovis* en el prepucio de una forma casi permanente, con consiguiente riesgo de contagio.

La mayor parte de los técnicos y científicos asumen de una manera excesivavente generalizada que las ovejas son relativamente resistentes a la infección y que no intervienen activamente en la epidemiología de la misma (3). Sin embargo, *B. ovis* se ha aislado como responsable de brotes de aborto y las ovejas infectadas han contribuido al mantenimiento activo de la infección en algunos casos (6). En condiciones naturales, tras ser cubiertas por carneros infectados, tan sólo una pequeña proporción de ovejas desarrolla una infección activa que puede provocar el aborto o el nacimiento de corderos poco viables (3). Estas ovejas infectadas pueden mantener una secreción vaginal activa durante varias semanas tras el aborto, pudiendo intervenir en transmisión activa a carneros durante la cubrición. Por otra parte, al menos en condiciones experimentales, uno de los órganos "diana" de la infección por *B. ovis* en ovejas es la mama, existiendo una excreción activa en leche, que puede durar varios años, constituyendo una potencial fuente de infección. Aunque no se han descrito casos de infecciones latentes en *B. ovis*, el fenómeno de latencia se da con alguna frecuencia en la brucelosis bovina por *B. abortus* y en la ovina por *B. melitensis*. Los hijos de madres infectadas podrían nacer infectados (infección "in utero") o bien infectarse en el periparto consumiendo leche

infectada, generando infecciones de tipo latente, con ausencia de respuesta inmune y por consiguiente, de dificil detección por métodos inmunológicos. Por tanto, en determinadas condiciones, el papel de la oveja en la transmisión y mantenimiento de la infección no debe despreciarse. En rebaños en los que la infección no ha podido ser erradicada controlando exclusivamente a los carneros, se tiende a pensar con demasiada alegría que las pruebas diagnósticas no son válidas, ignorándose totalmente el posible papel que pueden jugar las ovejas en el mantenimiento de la infección.

La probabilidad de que los animales se infecten depende fundamentalmente de la vía de infección, de la dosis infectante y de algunas características intrínsecas tales como la edad y la raza. En condiciones experimentales la infección puede transmitirse a través de las vías oral, conjuntival, prepucial, intravenosa, intratesticular, nasal y subcutánea, aunque los mejores resultados se obtienen con la inoculación conjuntival y prepucial simultáneamente. Usando estas dos vías simultáneamente y dosis de 10^8 a 10^9 *B. ovis* se consigue reproducir la infección en el 90-100% de los carneros inoculados (3).

Un aspecto epidemiológico controvertido es la diferente susceptibilidad según la edad de los animales. La infección ha sido demostrada, con cierta frecuencia, en carneros de alrededor de 5 meses de edad, lo que podría sugerir que los animales en la edad próxima a la pubertad son muy sensibles a la misma. Sin embargo, aceptando que la vía venérea pasiva a través de las ovejas es la más importante para la transmisión de la infección en sistemas de producción con monta continuada, los animales adultos tienen muchas más probabilidades de infectarse. De hecho, tanto la incidencia de alteraciones testiculares como la de brucelosis aumenta en función de la edad de los carneros (3). Sin embargo, esto no quiere decir que los carneros adultos sean mas sensibles que los jóvenes, sino que se trata de un problema de probabilidades; cuanto mas tiempo permanece un carnero en un medio infectado, mayor probabilidad tendrá de infectarse. Por lo tanto, no existe ninguna evidencia rigurosa que demuestre diferencias de susceptibilidad a esta infección en función de la edad de los animales.

Por otra parte, es un hecho comunmente descrito en la literatura que la raza Merina se encuentra menos afectada que las razas inglesas en condiciones de explotación similares (3). Sobre una base estadística, las razas autóctonas españolas Rasa Aragonesa y derivadas del Merino se infectan menos que otras razas europeas explotadas en España en condiciones similares (3). Aunque la resistencia genética a la infección mediante mecanismos de histocompatibilidad pudiera ser un fenómeno importante que explicase este diferente comportamiento, las diferencias de precocidad y actividad sexual entre estas razas pudieran ser el aspecto crucial para explicar el fenómeno.

La infección por *B. ovis* parece ser exclusiva de la especie ovina. Sin embargo, los machos cabríos inoculados experimentalmente pueden reproducir la infección en forma similar a los carneros, incluso presentando alteraciones testiculares (3). Como en nuestras condiciones de manejo en España es muy común la convivencia de ovejas y cabras, la transmisión de una especie a otra pudiera ocurrir en la naturaleza, aunque hasta el momento presente no existen referencias del aislamiento de *B. ovis* del ganado caprino en condiciones naturales. Tampoco existen evidencias de que esta infección afecte a la especie humana.

PATOGENIA Y CUADRO CLINICO

Como ya se ha indicado, *B. ovis* penetra en los tejidos a través de las mucosas oral, conjuntival, nasal, prepucial o vaginal. Inmediatamente después de la penetración, e independientemente de la

vía de entrada, las bacterias son transportadas, libres o en el interior de células fagocíticas, hasta los ganglios linfáticos más próximos al lugar de entrada. Si las bacterias no son destruidas, pueden sobrevivir largos periodos de tiempo en el interior de las células fagocíticas. El mecanismo exacto de esta supervivencia intracelular es desconocido, aunque pudiera estar directamente relacionado con la estructura de la membrana externa de la bacteria, capaz de resistir los mecanismos bactericidas de los fagocitos (7,8). Los ganglios linfáticos responden a la agresión por medio de una hiperplasia reticuloendotelial y linfoide, que puede tardar varias semanas en producirse y persistir durante meses (8). En condiciones experimentales, *B. ovis* permanece 2-3 semanas en los ganglios linfáticos próximos al lugar de inoculación antes de que la infección se disemine. Cuando las bacterias no son aisladas y destruidas en los ganglios, se produce la diseminación de la infección a través de la vía linfática o más frecuentemente a través de la vía hemática. La bacteriemia puede persistir intermitentemente durante meses, dependiendo de la resistencia del hospedador. Durante la fase crónica, la bacteriemia tiende a desaparecer, pero un porcentaje no despreciable de animales puede recidivar irregularmente. *B. ovis*, al igual que la mayoría de las bacterias intracelulares facultativas, produce inflamaciones crónicas de carácter granulomatoso en los órganos que parasita. La interacción de las bacterias con los componentes del suero (anticuerpos, complemento, etc), neutrófilos, macrófagos, fibroblastos y células epiteliales da como resultado la producción de una amplia variedad de mediadores capaces de activar los macrófagos, expandir clones de linfocitos T, estimular la hematopoyesis y en resumen, inducir una reacción inflamatoria (3). Existe un periodo de latencia relativamente largo (1-2 meses) antes de que aparezcan los signos clínicos. La diseminación hematógena permite la colonización del bazo, útero, placenta, glándula mamaria y ganglios linfáticos en ovejas, mientras que en los carneros la bacteria se localiza en órganos linfoides y principalmente en el epidídimo y las glándulas sexuales accesorias (vesículas seminales, ampollas del conducto deferente y glándulas bulbouretrales), por lo que la mayor parte de los carneros infectados eliminan *B. ovis* por el semen (3).

Las manifestaciones clínicas más importantes en los carneros son la epididimitis y la consiguiente disminución de la fertilidad, debido a la mala calidad del semen. Sin embargo, existen animales que presentan excreción seminal y que no tienen alteraciones testiculares (3). En la mayor parte de los animales la epididimitis es unilateral y localizada en la cola del epidídimo que suele tener un tamaño 3-4 veces superior al normal y consistencia muy dura. La superficie de sección es blanca y puede contener uno o varios granulomas espermáticos ocupados por una sustancia cremosa o caseosa. La túnica vaginal suele presentar adherencias con el epidídimo y/o testículo. No suelen apreciarse alteraciones macroscópicas en las glándulas sexuales accesorias. Las lesiones microscópicas iniciales en el epidídimo son hiperplasia y metaplasia del conducto epididimario, así como edema e infiltrados de linfocitos y macrófagos en el tejido perivascular. Posteriormente, el tejido intersticial sufre una fibrosis progresiva con persistencia de infiltrados de linfocitos y células plasmáticas. Los neutrófilos invaden el epitelio del conducto y la lisis celular subsiguiente origina quistes intraepiteliales que contienen restos celulares y neutrófilos. Como resultado de la hiperplasia epitelial y de la esclerosis se produce una estenosis del conducto epididimario, estasis espermático y extravasación de esperma, que dan lugar a la formación de los granulomas espermáticos. Los granulomas espermáticos y las adherencias con la vaginal pueden originar lesiones en el testículo, caracterizadas por estasis de espermatozoides, necrosis tubular con calcificaciones ocasionales y esclerosis. En las vesículas seminales y ampollas del conducto deferente se producen lesiones similares a las del epidídimo (9). Todas estas alteraciones se van produciendo lentamente y durante este tiempo una enorme cantidad de bacterias son excretadas

con el eyaculado
En las ovejas, *B. ovis* produce alteraciones en la circulación placentaria, que al interferir con la nutrición fetal provoca abortos o el nacimiento de corderos de poco peso y viabilidad (3,8,9) En infecciones experimentales la lesión más frecuentemente observada es una placentitis localizada preferentemente en la región intercotiledonaria, que presenta placas coalescentes de un exudado denso de color gris-amarillento Algunos cotiledones presentan zonas de necrosis y la placenta puede estar parcialmente separada del útero y unida sólo por algunas carúnculas (9) Las lesiones microscópicas suelen consistir en infiltrados de neutrófilos y macrófagos en el tejido intercotiledonario y trombosis de los vasos sanguíneos que presentan infiltrados celulares en las tunicas media y adventicia. En el endometrio y cotiledones los infiltrados celulares y la necrosis son las lesiones mas frecuentes (9).

DIAGNOSTICO SEROLOGICO

El diagnóstico clínico de la infección por *B. ovis* puede realizarse de una forma presuntiva mediante una palpación de los testículos de los carneros Sin embargo, este diagnóstico tiene un valor muy relativo debido a que las alteraciones testiculares pueden estar producidas por otros microorganismos (*Corynebacterium* spp , *Chlamydia* spp , *Actinobacillus* spp e Histophilus spp , principalmente) y a que aproximadamente tan solo un 50% de los animales infectados por *B. ovis* presentan alteraciones testiculares detectables por palpación (3)
Al igual que en la mayor parte de las enfermedades infecciosas, el unico diagnóstico inequivoco de la brucelosis ovina es el directo, consistente en el aislamiento e identificación de *B. ovis* a partir de exudados vaginales, abortos, leche, semen o tejidos de los animales Dado que el diagnostico directo es poco práctico para ser llevado a cabo rutinariamente en las campañas de control o para realizar estudios epidemiológicos de cierta envergadura, el diagnóstico que se utiliza mayoritariamente es el indirecto, basado en la demostración de una respuesta inmune frente a antígenos de *B. ovis* en determinadas pruebas serológicas

Para el diagnóstico serológico de esta infección se han utilizado una importante variedad de tecnicas tales como la aglutinación, hemaglutinación indirecta, inmunofluorescencia indirecta, precipitacion en gel, fijación del complemento y ELISA (3) Las diferencias en valor diagnostico dependen mayoritariamente de las características de la prueba y de la naturaleza del antígeno que se emplee
Las pruebas más utilizadas y más eficientes por su sensibilidad y especificidad son las pruebas de precipitación en gel (DDG y CIE), fijación del complemento (FC) y ELISA, utilizando extractos solubles de *B. ovis* como antígeno (10).
La Fijación del complemento (FC) es la prueba utilizada mayoritariamente para el diagnostico de la infección por *B. ovis*. La sensibilidad y especificidad de esta prueba dependen del tipo de antigeno utilizado, de la temperatura de incubación de la primera parte de la reacción (en frio a 4°C o en caliente a 37°C), así como del tiempo de incubación de la reacción. Los antígenos de *B. ovis* presentan frecuentemente una actividad anticomplementaria importante, que ha sido asociada con la presencia de bacterias completas o residuos celulares en las preparaciones antigénicas (11) Por lo tanto, los antígenos utilizados principalmente en FC son los obtenidos por extracción salina por calor (hot saline, HS) o procedimientos similares, o bien extractos libres de células obtenidos por sonicación. Los antígenos del tipo HS proporcionan mayor sensibilidad a la prueba de FC que los

obtenidos mediante sonicación o lipopolisacárido (LPS) rugoso obtenido por tratamiento con eter de petróleo-cloroformo-fenol (12). Aunque la prueba de FC con antígeno HS es bastante específica, pueden ponerse de manifiesto algunas reacciones cruzadas cuando se analizan sueros de animales infectados por *B. melitensis* o vacunados con la cepa Rev 1 (12).
Con respecto a la temperatura de incubación de la primera parte de la reacción de FC (mezcla suero-antígeno-complemento), las diferencias de sensibilidad entre el método frío (4°C toda la noche) y el caliente (37°C, 30-40 min.) no son muy significativas en nuestra experiencia. Sin embargo, ha sido citado que la sensibilidad del método frío es superior a la obtenida con la fijación en caliente, aunque las diferencias son mínimas cuando el tiempo de incubación de la fijación en caliente se aumenta hasta 60 minutos (3).
En estudios comparativos utilizando antígenos obtenidos por extracción salina, la sensibilidad de la FC es muy similar a la obtenida con la prueba de doble difusión en gel (DDG) y menor que la obtenida en ELISA con el mismo antígeno (10). Además, la prueba de FC presenta bastantes inconvenientes de orden técnico: precisa reactivos de gran variabilidad y tiene una gran complejidad técnica, la interpretación de los títulos bajos es muy subjetiva, existen sueros con poder anticomplementario, existen fenómenos de zona (prozona), que se caracterizan por reacciones positivas en las diluciones altas del suero y negativas en las bajas; finalmente, existe dificultad para realizarla con sueros hemolizados, que pueden coagularse durante la inactivación del suero
Para la detección de anticuerpos precipitantes frente a *B. ovis* se han utilizado varias técnicas de precipitación en gel Las utilizadas mayoritariamente son la de doble difusión en gel (DDG) y la de contrainmunoelectroforesis (CIE). La prueba de DDG realizada en portas para microscopio y utilizando antígeno HS de B ovis (13) es la mas utilizada. Esta prueba es muy simple y de bajo costo y proporciona una sensibilidad similar o incluso superior a la de la FC, siempre que se realice en las condiciones óptimas (3,10). En primer lugar, cada lote de antígeno HS debe titularse frente a una adecuada colección de sueros de carneros con cultivo positivo (la concentración óptima de antígeno varía entre 1 y 20 mg/ml, según lotes). En segundo lugar, los geles de agarosa deben contener adecuadas concentraciones de ClNa. Los geles con un 5% de ClNa mejoran la sensibilidad de aquellos que contienen tan sólo un 0,85% de ClNa, aunque si la concentración de ClNa se incrementa hasta el 10%, la sensibilidad es óptima para sueros ovinos (3). Los anticuerpos implicados en esta prueba son mayoritariamente del isotipo IgG1, lo que explicaría la gran correlación existente con la prueba de FC. Por su elevada sensibilidad y especificidad, por su sencillez, rapidez, economía y facilidad de realización en laboratorios poco especializados, esta técnica debería utilizarse en lugar de la prueba de FC para el diagnóstico de rutina de la infección por *B. ovis*.
La prueba de contrainmunoelectroforesis (CIE) con antígenos citoplasmáticos comunes a todo el género Brucella (3) también puede aplicarse al diagnóstico de la infección. Debido a que gran parte de estos antígenos de naturaleza proteica tienen una carga neta negativa, en unas determinadas condiciones (intensidad de corriente, tiempo, gel y buffer adecuados) tienden a migrar hacia el ánodo, mientras que las inmunoglobulinas tienden a migrar hacia el cátodo por electroendósmosis Cuando ambos constituyentes se encuentran, se producen las líneas de precipitación que indican la positividad de la reacción. La ausencia de líneas de precipitación indica una reacción negativa La ventaja principal de esta técnica sobre la DDG es que los resultados se obtienen en aproximadamente una hora. Sin embargo, la técnica requiere antígenos diferentes, la disponibilidad de una instrumentación especial y una mayor tecnificación del personal, por lo que en la práctica apenas se utiliza.

En los últimos años, una gran cantidad de esfuerzo ha sido dedicada a evaluar la sensibilidad y especificidad de la técnica ELISA para el diagnóstico de la infección por *B. ovis* La técnica más utilizada es un ELISA de tipo indirecto realizado en microplacas de poliestireno (3) Las principales diferencias entre las distintas técnicas publicadas residen en el tipo de antígeno, conjugado y sustrato utilizado.

Los sustratos para peroxidasa del tipo ABTS (2-2'-azino-di-3-ethylbenzthiazoline sulphonate), 5-amino salicílico y ortofenildiamina, dan resultados satisfactorios, aunque la mejor resolución (separación más neta entre las densidades ópticas de las poblaciones control positivo y negativo) se obtiene con ABTS (10). Al igual que en las otras pruebas serológicas, la sensibilidad y especificidad del ELISA depende mayoritariamente del tipo de antígeno que se utilice. El antígeno soluble obtenido por extracción por calor (HS) proporciona mejor sensibilidad y especificidad que el LPS libre de proteinas y que los antígenos obtenidos por sonicación (10). Finalmente, la utilización de conjugados IgG específicos (proteina G o monoclonales anti IgG1) mejora la especificidad de la técnica (separación mas neta entre positivos y negativos) utilizando conjugados policlonales (de especificidad H+L), pero a costa de disminuir la sensibilidad (14). La técnica ELISA con antígeno HS proporciona mejor sensibilidad que las pruebas de DDG y FC con el mismo antígeno (10). Sin embargo, existen sueros de animales infectados que son negativos en ELISA y positivos en DDG y viceversa. Por el contrario, la FC no mejora la sensibilidad ni de la DDG ni del ELISA. En consecuencia, la asociación de las pruebas de DDG y ELISA proporciona la máxima sensibilidad (10).

CONTROL Y PROFILAXIS

Para el control de la infección por *B. ovis* en ganado ovino es preciso tener en cuenta las tres consideraciones siguientes:

1) Ninguna prueba de diagnóstico individual que da resultado negativo permite afirmar con el 100% de seguridad que un animal no esta infectado. El diagnóstico debe ser siempre una operación colectiva, es decir un diagnóstico de rebaño. Un animal infectado significa que el rebaño esta infectado.

2) Un animal diagnosticado como infectado en un momento determinado de su vida debe ser considerado como tal, aunque sea negativo en controles posteriores.

3) Al igual que en el caso del diagnóstico, la profilaxis de la brucelosis debe considerarse como una operación colectiva. La unidad mínima de intervención es el rebaño, y en determinadas circunstancias, la totalidad de los rebaños de la zona considerada.

Como condición previa para iniciar cualquier tipo de programa de control debe conocerse la situación epidemiológica real y determinarse la zona de actuación.

El objetivo final de cualquier programa de control debería ser la erradicación total de la infección en la zona considerada y este objetivo debe ajustarse a las condiciones epidemiológicas de la zona en cuestión. Los dos programas aplicables al control de la brucelosis ovina por *B. ovis* son

1. Erradicación a corto plazo

Este programa se basaría en el diagnóstico serológico y en el sacrificio de los animales seropositivos (Test and Slaughter) y sería adecuado para aquellas zonas en las que la situación epidemiológica es muy favorable y las tasas de infección son bajas. Para que este programa tenga éxito son necesarios:

- La disponibilidad de personal dedicado exclusivamente al programa, de un laboratorio eficiente con técnica rigurosa y repetible.
- La identificación y mantenimiento de rebaños indemnes a partir de los cuales realizar las reposiciones.
- Poseer un sistema de identificación y de control de los animales infectados, que asegure su eliminación rápida y efectiva, evitando fraudes y movimientos de ganado peligrosos. Jamas se deberá permitir la entrada de carneros y ovejas a un rebaño saneado mientras no procedan de otro rebaño con igual situación epidemiológica.
- La puesta en marcha de un sistema de control epidemiológico en la totalidad de los rebaños de la zona. La realización de las pruebas de DDG y/o ELISA, dos veces al año en los carneros sería lo más recomendable. Un rebaño no debería considerarse libre hasta que no se obtuvieran resultados negativos consecutivamente durante un periodo de dos años. Si a pesar de aplicar rigurosamente este esquema de control, no se obtuviese el éxito deseado en determinados rebaños, sería recomendable extender el control a la ovejas, para evitar el mantenimiento de la infección a través de las mismas.

2. Programa combinado de vacunación y diagnóstico serológico.
A primera vista, este programa no presenta grandes ventajas ni diferencias con el anterior. Sin embargo, sería irrealista aplicar un programa de control por sacrificio en zonas de prevalencia elevada, de difícil control y en rebaños de gran tamaño, sin detener previamente la propagación de la enfermedad mediante la vacunación.
Las bases principales para obtener éxito serían:
- Cumplir las condiciones descritas para el programa anterior, sacrificando los carneros (y eventualmente ovejas en rebaños problema) seropositivos.
- Vacunar la totalidad de los carneros de reposición y de los carneros adultos seronegativos (y eventualmente las ovejas en rebaños problema). Sin ninguna duda, esta es la base principal del programa. El problema crucial es utilizar una vacuna o técnica de vacunación que sea compatible con el análisis serológico ulterior. La administración de dosis completas (10^9) de vacuna viva *B. melitensis* Rev 1 por vía subcutánea, proteje eficazmente frente a la infección por *B. ovis*, pero provoca una respuesta serológica de gran intensidad y duración frente a antígenos lisos (*B. abortus* - *B. melitensis*) y también frente a antígenos de *B. ovis*, si bien con menor intensidad (15). La administración conjuntival de esta vacuna proteje eficazmente a los carneros frente a *B. ovis* y reduce todavía más esta respuesta indeseable frente a antígenos de *B. ovis* (15). Sin embargo, al no existir la infección por *B. melitensis* en Uruguay, esta vacuna viva estaría desaconsejada, siendo preciso utilizar otras vacunas, pero ¿qué vacunas?. Otras cepas vacunales vivas derivadas de especies existentes en Uruguay como la cepa S2 (derivada de *B. suis*) o como la RB51 (derivada de *B. abortus*) han dado pésimos resultados de protección frente a *B. ovis* (16,17) y deben también descartarse. La única posibilidad por el momento sería utilizar vacunas subcelulares que, conteniendo determinados antígenos en adyuvantes adecuados, han demostrado ser tan eficaces como la cepa Rev 1 (18). El problema de estas vacunas inactivadas es que precisan revacunaciones para ser eficaces y además interfieren notablemente con el diagnóstico serológico (18), dificultando extraordinariariamente la aplicación de este programa combinado de control.

En conclusión, en este momento en Uruguay la aplicación de este programa combinado de control sería muy dificultoso, en tanto en cuanto no se desarrollen nuevas vacunas y/o procedimientos de

diagnóstico totalmente compatibles.

TRATAMIENTO

La infección por *B. ovis* en carneros puede ser tratada adecuadamente mediante una combinación de 7 inyecciones con tres días de intervalo de Oxitetraciclina (Terramicina LA, Pfizer, 20 mg/Kg) y de una inyección diaria durante 21 días de sulfato de dihidroestreptomicina (20 mg/Kg). Al menos en condiciones experimentales, este tratamiento es capaz de curar alrededor del 90% de los carneros infectados (19). Sin embargo, el elevado coste del tratamiento y la posible existencia de lesiones que pudieran mermar la fertilidad de los animales tratados (19), hacen poco aplicable dicho tratamiento en la práctica.

REFERENCIAS

1. Luchsinger D.W., Anderson R.K. (1979). Am. J. Vet. Res., 40, 1307.

2. Alton G.G., et al. (1989). Laboratory techniques for the Brucellosis laboratory, INRA ed., 1989.

3. Blasco J.M. (1990). En: Animal Brucellosis. Nielsen & Duncan Ed., CRC Press.

4. Farrell I.D. (1974). Res. Vet. Sci., 16, 280.

5. Brown G.M. et al. (1971). Cornell Vet., 61, 265.

6. Marco J., et al. (1994) Vet. Rec., 135, 254.

7. Mims C.A. (1987). En:The pathogenesis of infectious diseases. Academic Press, 3rd ed.

8. Thoen C.O., Enright F. (1986). En: Pathogenesis of bacterial infections in animals. Iowa State University Press.

9. Jubb K. et al. (1985). En: Pathology of domestic animals. Vol. 3. Academic Press. 3rd ed.

10. Marin C.M. et al. (1989). Vet. Rec., 125, 504.

11. Clapp K.H. (1961). Aust. Vet. J., 37, 188.

12. Riezu J.I. et al. (1986). J. Clin. Microbiol., 23, 938.

13. Myers D.M. y Siniuk A. (1970). Appl. Microbiol., 19, 335.

14. Ficapal A. et al. (1995). Vet. Rec. (en prensa)

15. Marín C.M. et al. (1990). Res. Vet. Sci., 48,209.

16 Blasco J M et al (1993) Vaccine. 11 1291

17 Jimenez de Bagues M P et al (1995) Vaccine. (en prensa)

18 Blasco J M et al (1993) Vet Immunol Immunopath . 37. 257

19 Marin C M et al (1989) Am J Vet Res . 50. 560

AGRADECIMIENTOS

Esta jornada se realizó con la colaboración de las siguientes personas:

- Ing. Agr. Marcia del Campo
- Ing. Agr. Gustavo Brito
- Sra. Cristina Gaggero
- Sr. Miguel Ferraz
- Sr. Héctor Sosa