UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
Facultad de Ciencias Veterinarias

Instituto de Microbiología
Facultad de Ciencias.

Evaluación de la protección conferida a carnerillos inmunizados con Cepa RB51, frente a una infección experimental con *Brucella Ovis*

Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos para optar al Grado de LICENCIADO EN MEDICINA VETERINARIA.

Sergio Alfredo Pérez Hernández
Valdivia Chile 1997

PROFESOR PATROCINANTE : DRA. XIMENA ROJAS S.

PROFESOR COPATROCINANTE : DR. NESTOR TADICH B.

PROFESOR COLABORADOR : SRA. ORIELE ALONSO.

PROFESORES CALIFICADORES : DR. RAFAEL TAMAYO C.

DR. HUGO FOLCH V.

FECHA DE APROBACION :

Al esfuerzo de mis padres, a todo su amor.

A mis hermanos.

INDICE

	Pag.
1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	2
3. INTRODUCCION	3
4. MATERIALES Y METODO	5
5. RESULTADOS	11
6. DISCUSION	31
7. CONCLUSIONES	34
8. BIBLIOGRAFIA	35
9. ANEXOS	38

EVALUACION DE LA PROTECCION CONFERIDA A CARNERILLOS INMUNIZADOS CON CEPA RB51, FRENTE A UNA INFECCION EXPERIMENTAL CON *Brucella ovis*

1. RESUMEN

Se realizaron dos experimentos para evaluar la protección de *B. abortus* cepa RB51 en carnerillos infectados experimentalmente con *B. ovis.* Para ello se utilizaron 9 carnerillos en cada experimento, en el primero se dividieron en grupo control y grupos 1 y 2 con 3 carnerillos cada grupo; en el segundo experimento se dividieron en un grupo control con 3 carnerillos y un grupo experimental con 6 carnerillos.

En el primer experimento se vacunaron vía subcutánea, en la tabla del cuello, el grupo control con 1 ml de PBS (Buffer Fosfato Salino), los grupos 1 y 2 fueron vacunados con 1 ml de RB51 en concentración de $10x10^9$; 20 días después el grupo 2 fue revacunado con 1 ml de RB51 en concentración $4{,}5x10^9$. En el segundo experimento se vacunaron vía subcutánea detrás de la escápula izquierda. el grupo control con 1 ml de PBS, el grupo experimental en dos ocasiones con 1 ml de RB51 en concentración de $1x10^9$ y $l0xl0^9$ con un intervalo de 14 días, a excepción del carnerillo 7 que sólo se vacuno con la primera dosis.

Los carnerillos del primer experimento fueron desafiados el día 94, 97 y 103 del experimento vía prepucial, con una suspensión de 13 ml de *B. ovis* (Winter) en concentración de $5x10^8$. En el segundo experimento se desafiaron el día 61 del experimento por inyección en epidídimo izquierdo con una suspensión de 0,5 ml de *B. ovis* en concentración de $1x10^9$; los epidídimos derechos de los carnerillos y ambos epidídimos del carnerillo 1 fueron inyectados con 0.5 ml de PBS.

Se realizaron pruebas serológicas (Inmuno Difusión en Gel, Rosa de Bengala y Rivanol). prueba cutimétrica (sólo en primer experimento), signología clínica (medición de diámetro testicular y palpación de testículos y epidídimos), tinción de Boddie y cultivos para detectar y asilar *B. ovis* desde semen y lesiones de epidídimos.

Los resultados muestran que se desarrollaron lesiones en testículos y epidídimos en ambos experimentos tanto en grupos controles como experimentales, así como disminución de diámetro testicular. Hubo sensibilización linfocitica en el carnerillo 9 (vacunado dos veces) del experimento 1. Las pruebas serológicas muestran presencia de anticuerpos a cepas lisas en el carnerillo 8 del primer experimento, así como anticuerpos a cepas rugosas en ambos carnerillos. Las pruebas bacteriológicas mostraron la presencia de *B. ovis* como también *B. abortus.*

La cepa RB51 no tuvo acción protectiva en estos experimentos, en contraposición a los resultados obtenidos en otras especies animales.

Palabras claves: RB51, *B. ovis,* vacunación, carnerillos.

EVALUATION OF THE PROTECTION INDUCED BY RB51 VACCINE IN RAMS EXPERIMENTALLY INFECTED WITH *Brucella ovis*

2. SUMMARY

In order to evaluate the protection induced by strain RB51 of *B. abortus* in rams experimentally infected with *B. ovis,* two experiments were carried out. Nine rams were used in each experiment In the first one. the rams were divided into a control group and experimental groups 1 and 2 with 3 rams each group; in the second experiment they were divided into a control group that consisted in 3 rams and an experimental group with 6 rams.

In the first experiment a subcutaneus vaccination in the neck was carried out. The control group received 1 ml PBS (Buffer Fosfate Saline), and the experimental groups 1 and 2 received 1 ml of RB51 at a concentration of $1x10^9$; 21 days later, group 2 was revaccinated with 1 ml of RB51 at a concentration of $4.5xl0^9$. In the second experiment they were vaccinated subcutaneously behind the left scapula The control group received 1 ml of PBS, and the experimental group received 1 ml of RB51 in two occasions at concentrations of $1x10^9$ and $10x10^9$, with an interval between them of 14 days. The exception was ram number 7 witch only received one vaccine dose.

The rams in the first experiment were challenged on days 94, 97 and 103, with a solution of 13 ml *B. ovis* (Winter) at a concentration of $5x10^8$, through the prepuce, hi the second experiment they were challenged on day 61 by injection in the left epididimi with 0.5 ml of a solution of *B. ovis* at a concentration of $1x10^9$ the right epididimi and both epididimi of ram number 1 were injected with 0.5 ml of PBS.

Serological tests (Gel Immunodiffussion, Rose Bengal and Rivanol), skin test (only in the first experiment), clinical signs (measured of the testis diameter and palpation of testis and epididimi). Boddie staining and culture in order to detected and isolate *B. ovis* from semen epididimal lesions were carried out.

The results showed that lesions were developed in the testis and epididimus in the control and experimental groups of both experiments, toghether with a decrease in size of testis. There was a lymphocite senzitation in rams number 9 (vaccinat twice) in experiemt 1. The serological test show the presence of antibodies against tough strain in ram number 8 of the first experiment toghether with antibodies against rough strain in all rams The bacteriological tests showed the presence of *B. ovis* and *B. abortus.*

The RB51 vaccine did not have protective action in these experiments, wich is different from happens in other animal species.

Key words: RB51, *B. ovis,* vaccination, rams.

3. INTRODUCCION

La explotación de la especie ovina cumple un rol importante en la ganadería, representando, en muchos casos. la única actividad pecuaria capaz de sostenerse en forma permanente en los ambientes que ocupa De esta forma, constituye una fuente interesante para la producción de carne, lana cueros y leche (Hervé, 1991)

En Chile, la explotación ovina es un subsector de la ganadería Hervé en 1991, informa que representa el 5% del "stock" de capital; el 3% del empleo y el 1% del valor de la producción agropecuaria. En la IX y X región esta orientada y desarrollada principalmente como rebaños familiares, siendo fuente de autoconsumo de carne y lana En la XII región, en cambio, se concentra la mayor cantidad de ovinos, correspondiendo al 40% de la masa total a nivel nacional, estimada en 4.694.140 cabezas, según el INE (1994).

Toda explotación pecuaria está sometida a riesgos, entre las que se encuentran las enfermedades infecciosas y dentro de ellas se encuentra la brucelosis Aun cuando el ovino es susceptible a especies lisas de *Brucella.* la infección por *B. ovis,* especie rugosa responsable del cuadro conocido como epididimitis del carnero y específica del ganado ovino, es la que genera mayores problemas reproductivos (Blasco. 1990).

De acuerdo con Pinochet (1985), las infecciones por *R. ovis* en el país fluctuarían entre un 5% y un 17%. Rojas y col (1990), observaron una prevalencia de 2,8 a 8,3% en ovinos adultos de rebaños de pequeños productores de la Décima Región.

El cuadro que *B. ovis* genera en esta especie constituye una enfermedad venérea en la cual el macho es el mas afectado, en tanto la hembra es, más bien reservorio y diseminadora de la infección (Burgess y col. 1982). Se considera que *B. ovis* posee baja patogenicidad para las hembras o estas son relativamente mas resistentes que los carneros (Hughes. 1972; Blasco, 1990).

En el macho las lesiones y signos se centran en el epidídimo y testículos, produciendo destrucción del epitelio, degeneración y fibrosis como consecuencia de la reacción inflamatoria Además. se producen cambios en las características seminales y, por lo tanto, baja su calidad (Hughes y Claxton, 1976; Bagley y col. 1984; Thoen y Enright, 1986; Jensen y Swift, 1988).

El diagnóstico de la enfermedad se puede realizar a través del examen clínico del genital del macho; examen bacteriologico por cultivo de semen (Hughes y Claxton. 1976; Webb y col. 1980; Blasco y col., 1987), y el diagnostico serológico por métodos como Enzimo Inmuno Ensayo (ELISA), Fijación de Complemento (FC) e Inmuno Difusión en Gel (IDG) (Alton y col, 1988), siendo éste último la técnica oficial en Chile (Rojas, 1991).

El control de la enfermedad en Chile, se basa en el diagnostico precoz y eliminación de los animales positivos (Rojas y col., 1990). En relación al tratamiento, se han utilizado antibióticos y dado por los costos que implica sólo podría recomendarse en animales de valor genético (Blasco, 1990).

En el animal, el mecanismo de defensa ante la infección por cepas de *Brucella,* está dada por macrófagos y leucocitos polimorfonucleares. La activación de los macrófagos se produce cuando los linfocitos T son estimulados para liberar linfoquinas. La liberación de estos factores activadores depende del reconocimiento

del antígeno apropiado por el linfocito T La estimulación de los leucocitos puede producirse naturalmente por infección o mediante vacunas, las cuales se elaboran con diferentes cepas vivas o muertas (FAO/OMS, 1986).

Estas vacunas son utilizadas para prevenir la enfermedad y representan una buena práctica y rentable en el control de *B. ovis* (Blasco, 1990). Se han utilizado mezclas de *B. ovis y B. abortus* cepa 19 (Buddle y col., 1963; Pinochet y col, 1981), esta tiene desventajas ya que, la cepa 19 puede colonizar los genitales y ser excretada por el semen, persistiendo por períodos largos, con riesgo de provocar epididimitis después de la vacunación. También se ha descrito laminitis y epifisitis causadas por esta cepa. Además, la respuesta inmune que genera, produciría interferencia en las pruebas serológicas para detectar *B. ovis* y *B. melitensis* (Mc Gowen y Harrold, 1979; Blasco, 1990).

También se ha utilizado *B. melitensis* Rev. 1, la cual, protegería contra *B. ovis y B. melitensis.* Sin embargo, se ha aislado de corderos vacunados que han desarrollado epididimitis y tiene el inconveniente de producir interferencia en las pruebas serológicas de diagnóstico (Blasco y col, 1987; Jensen y Swift. 1988). En Chile, la vacuna Rev. 1 no está permitida (SAG. 1970)

En la búsqueda de nuevas vacunas se desarrolló una mutante de *B. abortus* cepa 2308, conocida como RB51. Es una cepa rugosa, estable tanto in vitro como in vivo; carece de la cadena O en el lipopolisacárido de superficie de la pared celular (Schurig y col., 1995). Se ha demostrado que produce cierto grado de inmunidad contra infecciones con *B. abortus, B. melitensis* y *B. ovis* en ratones, como también, contra *B. abortus* en vacas, basando su acción en inmunidad mediada por células (Schurig y col.. 1991; Enright y col., 1994; Jiménez de Bagues y col., 1994; Folch y col., 1995; Zambrano y col., 1995).

El objetivo de este estudio es el de evaluar la protección conferida por la vacunación de carnerillos con la cepa RB51, desafiados experimentalmente con *B. ovis.*

La hipótesis nula (H_o) es que, no existirían diferencias en cuanto a la protección, frente a un desafío con *B. ovis,* entre aquellos carnerillos vacunados con la cepa RB51 y aquellos no vacunados.

La hipótesis alternativa (H_a) es que, la cepa RB51 utilizada como vacuna confiere protección a aquellos carnerillos vacunados y desafiados experimentalmente con *B. ovis.*

4. MATERIALES Y METODO

Se plantearon dos experimentos:

EXPERIMENTO 1

4.1. MATERIALES:

4.1.1. Animales:

Se utilizaron 9 machos enteros, Suffolk y Romney Marsh, menores de un año, los que se mantuvieron en pastoreo en una primera etapa y posterior al desafío se estabularon en forma conjunta En esta segunda etapa la alimentación consistió en pasto seco, concentrado y agua ad libitum.

Los animales fueron divididos al azar, en 3 grupos, de tres carnerillos cada uno El grupo 1 constituyo el grupo control, en tanto que el 2 y 3 fueron grupos experimentales Todos los carnerillos fueron marcados con autocrotales con una numeración correlativa desde el numero 1 al 9.

4.1.2. Cepas bacterianas:

Las cepas bacterianas utilizadas fueron *B. abortus* cepa RB51 como vacuna y *B.* ovis (cepa Winter) como infectante, ambas facilitadas por el Dr. Gerhard Schurig. Virginia Tech, U.S.A.

La preparación de la vacunas fue realizada reconstituyendo la cepa RB51 (Ba(S):6/C2), en 1 ml de agua bidestilada estéril. De ésta dilución se sembró en placas de agar tripticasa, incubadas en aerobiosis a 37° C por 48 hrs. Luego se cosecho en PBS (Buffer Fosfato Salino), pH 7, estéril y se ajusto a una concentración de 10×10^9. Para la segunda vacunación, se ajusto a una concentración de $4{,}5 \times 10^8$. Ambas concentraciones ajustadas por método nefelométrico. En el momento de la preparación se comprobó la rugosidad de la cepa mediante la técnica de Cristal Violeta (Alton y col, 1988).

La preparación del inoculo infectante se realizó previa siembra de *B. ovis* (cepa Winter) en agar sangre, incubada a 37°C en atmósfera de 10% de CO_2. Una vez obtenido el crecimiento se cosecho en PBS (Buffer Fosfato Salino), estéril. pH 7, ajustándose a una concentración de 5×10^8, por método nefelométrico.

4.2 METODO:

4.2.1. Vacunación:
Grupo control: constituido por los carnerillos 1. 2 y 3. Se inocularon con 1 ml de PBS (Buffer Fosfato Salino) en la tabla del cuello, por vía subcutánea.

Grupo experimental 1: constituido por los carnerillos números 4, 5 y 6 Se inocularon con 1 ml de la cepa RB51 en una concentración de 10×10^9, en la tabla del cuello vía subcutánea.

Grupo experimental 2: constituido por los carnerillos números 7, 8 y 9. Se inocularon subcutáneamente en dos ocasiones, con un intervalo de 20 días, con la cepa RB51. La primera, con un inóculo de 1 ml y una concentración de 10×10^9 y la segunda, con igual cantidad y una concentración de $4{,}5 \times 10^8$.

4.2.2. Prueba cutimétrica:
Esta prueba se realizó el día 47 del experimento, 27 días después de la segunda vacunación, a un carnerillo de cada grupo (números 1, 4 y 9), con el objeto de determinar el grado de sensibilización.

Se midió el pliegue cutáneo en la tabla del cuello, previa depilación, con un pie de metro marca Manostat^R, posteriormente se inoculó, intradérmicamente, 100 ug de un extracto de proteínas de la cepa RB51, obtenido por ruptura celular, en un volumen de 0,1 ml[1]. Setenta y dos horas después se midió el pliegue cutáneo del sino de la inoculación. Las mediciones realizadas fueron expresadas en milímetros (mm).

4.2..3. Desafío:
Todos los carnerillos fueron sometidos a desafío, en tres ocasiones, con una suspensión de *B. ovis* (cepa Winter), aplicada en una concentración de 5×10^8. El primer desafío se realizó noventa y cuatro días después de la primera vacunación, repitiéndose a los tres y nueve días posterior al primer desafío.

El método de infección experimental utilizado, consistió en:

- Exposición del pene y sensibilización de la mucosa con una esponja frotándola suavemente.
- Introducción de una cánula en el pliegue prepucial, presionando el orificio prepucial mientras se inyectó 13 ml de suspensión de *B. ovis* (cepa Winter).
- Se dejó la suspensión por 20 segundos, masajeando el prepucio. Luego de este tiempo el animal se dejo libre, eliminándose por gravedad el exceso de la suspensión.

El esquema de vacunaciones y desafíos se muestra en el Cuadro 1.

[1] Producido por el Instituto de Inmunología de la Universidad Austral de Chile.

CUADRO 1

Esquema de vacunaciones y desafíos realizados en el experimento 1.

	Vacunaciones		
Carnerillo	1ª Vacunación Día 0	2 ª Vacunación Día 20	Desafíos (*)
1 2 Control 3	1 ml PBS		$5x10^8$
4 5 Grupo 1 6	1 ml RB51 $10x10^9$		$5x10^8$
7 8 Grupo 2 9	1 ml RB51 $l0xl0^9$	1 ml RB51 $4.5x10^8$	$5x10^8$

(*): Días 94, 97 y 103 después de la primera vacunación.

4.2.4. Evaluación clínica:
Se realizó un examen clínico de los genitales de los carnerillos, que consistió en la palpación de los testículos y epidídimos y medición de diámetro testicular. Su objetivo fue determinar posibles lesiones, diferencias de tamaño y consistencia de testículos y epidídimos. Estos exámenes se realizaron previo a las vacunaciones y desafíos y a los 9, 21 y 67 días después del primer desafío. Todas las mediciones fueron expresadas en centímetros.

4.2.5. Obtención de muestras para pruebas serológicas:
En cuatro oportunidades, a cada animal se le extrajo, aproximadamente, 10 ml de sangre de la vena yugular con tubos al vacío, sin anticoagulante. La primera previo a la primera vacunación; la segunda posterior a la primera vacunación y previo a la segunda vacunación; la tercera posterior a las vacunaciones y previo al primer desafío y, la cuarta después del ultimo desafío (Anexo 1). El suero obtenido, una vez coagulada la sangre, se centrifugo a 1500 rpm por 10 minutos y fue traspasado a tubos Epenndorf. siendo congelado a -23°C hasta el momento de ser utilizadas

4.2.6. Análisis serológico:

Los sueros fueron sometidos a pruebas de Rosa dc Bengala (RB) y Rivanol (Riv)[2], esta sólo si era positivo a RB Ambas pruebas utilizadas para detectar posibles anticuerpos contra cepas lisas. El resultado dc estas pruebas, se interpreta como positiva si se presentan flóculos de aglutinación

Para la detección de anticuerpos producidos por cepas rugosas, se aplico la prueba de Inmuno Difusión en Gel en placa (IDO) [3]. En esta prueba se indica como reacción positiva bandas de precipitación entre el suero problema y el antígeno.

4.2.7. Análisis bacteriológico:

Tres días después del primer desafío se tomaron muestras de la mucosa peneana y prepucial a todos los carneros, los que se cultivaron en caldo tripticasa adicionado con suero e incubados a 37°C en microaerobiosis por 3 días Posteriormente se realizaron frotis y tinción de Boddie.

Nueve semanas después del primer desafío se realizó electroeyaculación. El semen obtenido fue sembrado en agar sangre e incubado a 37°C en microaerobiosis y sometido a tinción de Boddie. A las colonias desarrolladas se les determino características de crecimiento y se les realizó tinción de Boddie

4.2.8. Castración:

Se efectuó 85 días después del primer desafío. Se realizó frotis y tinción de Boddie de estromas testiculares y lesiones de epidídimos. Paralelamente se sembraron en agar sangre e incubaron a 37°C en microaerobiosis por 4 días.

---

[2]. Para las pruebas de RB y Riv, se utilizó el antígeno oficial, preparado en el Instituto de Microbiología de la Universidad Austral de Chile conforme a las normas de la Organización Panamericana de la Salud (OPS).

[3]. Para la prueba de Inmuno Difusión en Gel se siguió el procedimiento indicado por la Organización Panamericana de la Salud (OPS).

EXPERIMENTO 2

4.3. MATERIALES:

4.3.1. Animales:

Se utilizaron 9 machos enteros Romney Marsh, menores de un año, los cuales se mantuvieron en estabulación en corrales individuales e independientes. La alimentación se base en pasto seco, concentrado y agua ad libitum.

Los animales fueron asignados al azar en dos grupos, un grupo experimental y uno control El grupo experimental contó con 6 animales y el grupo control con 3. Los animales fueron marcados previamente con autocrotales y numerados del 1 al 9.

4.3.2. Cepas bacterianas:

Al igual que en el experimento 1. las cepas utilizadas fueron *B. abortus* cepa RB51 como vacuna y *B. ovis* (cepa Winter) como infectante La preparación y obtención de las suspensiones y diluciones para las vacunas e inoculo infectante tuvieron idéntico procedimiento que en el experimento 1.

4.3.3. Vacunación:

Grupo control: constituido por carnerillos números 1, 4 y 5. Se inocularon con 1 ml de PBS (Buffer Fosfato Salino), vía subcutánea detrás de la escápula izquierda.

Grupo experimental: conformado por los carnerillos números 2. 3, 6. 7, 8 y 9. Con excepción del carnerillo 7, todos fueron vacunados en dos ocasiones, con un intervalo de 14 días, con una suspensión de RB51 en una concentración de 1×10^9 en la primera y, en la segunda con una concentración de 10×10^9. El carnerillo 7 sólo recibió la primera vacuna La cantidad vía y lugar de inoculación para todos los animales fue igual a la del grupo control.

43.4. Desafío:

Los carnerillos fueron desafiados 61 días después de la primera vacunación. Para ello, se inyecto al epidídimo izquierdo 0.5 ml de una suspensión de *B. ovis* (cepa Winter), en una concentración de 1×10^9. En el epidídimo derecho se aplico 0.5 ml de PBS estéril. El carnerillo 1. se le aplico 0.5 ml de PBS en ambos epidídimos. De este modo, tanto el epidídimo derecho de todos los carnerillos como ambos epidídimos del carnerillo 1 sirvieron como control.

El método de desafío experimental utilizado consistió en:

- Depilación de la cola de epidídimos de ambos testículos, un día antes del desafío.
- Desinfección con alcohol, previo inoculación.
- Inyección intraepidídimo de PBS estéril pH 7, en la cola de los epidídimos derechos, en un volumen de 0,5 ml cambiando de aguja entre cada carnerillo.
- Inyección de una suspensión de *B. ovis* (cepa Winter), en concentración $1 \times l0^9$, en la cola de los epidídimos izquierdos, en un volumen de 0,5 ml, cambiando de aguja entre cada carnerillo.

Un esquema de vacunaciones y desafíos se presenta en el Cuadro 2.

CUADRO 2

Esquema de vacunaciones y desafío realizados en los carnerillos del experimento 2.

	Vacunaciones		
Carnerillo	1 [a] Vacunación Día 0	2 [a] Vacunación Día 14	Desafío Día 61
1 4 Control *5*	1 ml PBS		PBS $1x10^9$ $1x10^9$
2 3 Gr. exp. 6	1 ml RBS1 $1x10^9$	1 ml RB51 $10x10^9$	$1x10^9$
7(*) 8	1 ml RB51 $1x10^9$		$1x10^9$
9	1 ml RBSl11$x10^9$	1 ml RB51 $10x10^9$	$1x10^9$

(*): No se le aplico la segunda vacuna.

4.3.5 Evaluación clínica:
Se realizó igual procedimiento que en el experimento 1. El primer examen se realizó previo a las vacunaciones, desafío y posterior a estos, obteniéndose un total de 10 evaluaciones. Todas las mediciones fueron expresadas en centímetros.

4.3.6. Obtención de muestras para serología:
Para la realización de exámenes serológicos, de cada animal se extrajo, aproximadamente, 10 ml de sangre de la vena yugular con tubos al vacío. La primera muestra previo a la primera vacunación; la segunda posterior a la primera vacunación y previo a la segunda vacunación: la tercera posterior a las vacunaciones y previo al desafío; la cuarta y quinta muestra. fueron tomadas después del desafío (Anexo 2). Una vez coaguladas las muestras se siguió el mismo procedimiento descrito en el punto 4.2.6.

43.1. Castración:
Cuarenta y nueve días después del desafío se realizó la castración de los carneros. Se obtuvieron muestras de tejido testicular y de epidídimo. Estos se sembraron en caldo tripticasa con suero a 37° C por 2 días.

Posteriormente. las muestras fueron maceradas y cultivadas en agar sangre e incubados a 37° C en medio microaerobio por 4 días, además, se les realizo frotis y tinción de Boddie.

5. RESULTADOS

EXPERIMENTO 1

5.1. Evaluación clínica:

En la primera, segunda y tercera evaluaciones clínicas no se constataron alteraciones en testículos y epidídimos de ningún carnerillo.

Solo en la cuarta evaluación (21 días después del primer desafío), se observe distribución de los diámetros testiculares A la palpación de los epidídimos, se determino epididimitis izquierda del carnerillo 4 y derecha de los carnerillos 8 y 9.

En la quinta evaluación (67 días después del primer desafío), se determino en forma clara que todos los carnerillos, a excepción del carnerillo 1. presentaban lesiones palpables en epidídimo. Se observe, al igual que en la cuarta evaluación, disminución del diámetro testicular, siendo mayor en los carnerillos 3. 5 y 8. (Anexo 3).

Los testículos mantuvieron su simetría, a excepción del carnerillo 5, el cual presentó disminución de tamaño testicular derecho, y los carnerillos 7 y 9 que presentaron disminución de tamaño testicular izquierdo.

Excepto por el carnerillo 1, los otros carnerillos presentaron asimetrías en los epidídimos, caracterizadas por aumentos de volumen de consistencia firme, de ubicación preferencial en la cola de estos (Cuadro 3; Anexo 4).

En el grafico 1 se presentan los promedios por grupo de las mediciones de diámetro testicular de los carnerillos.

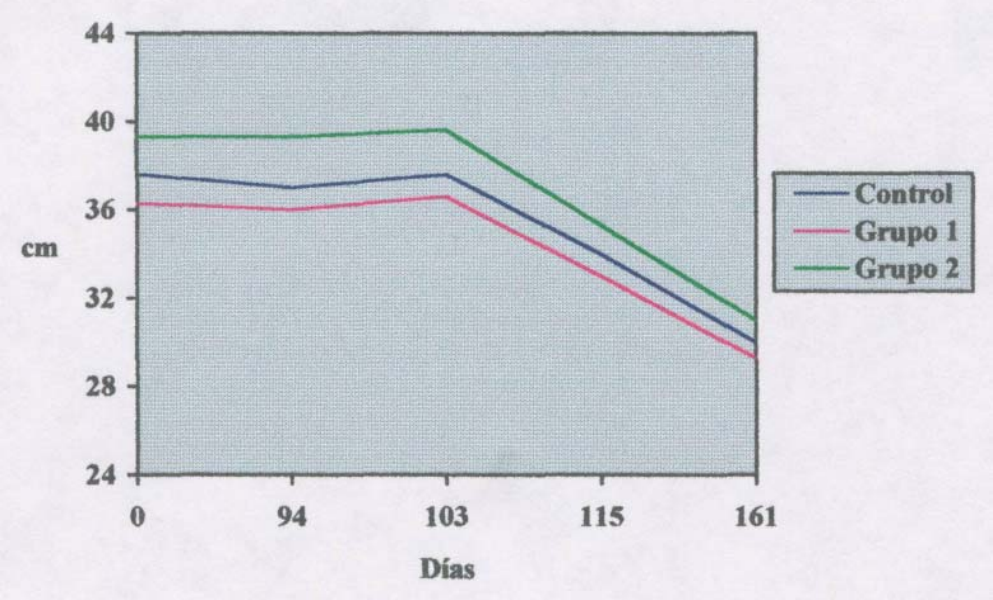

GRAFICO 1

Promedios de mediciones (cm) de diámetro testicular por grupos, obtenidas los días 0,94,103,115 y 161 del experimento 1.

El grafico 1 muestra que los carnerillos del grupo control tanto como los experimentales vacunados una y dos veces tuvieron disminución de su diámetro testicular, observándose desde la cuarta medición (21 días después del primer experimento).

CUADRO 3

Lesiones encontradas a la palpación-presión de testículos y epidídimos. (73 días después del primer desafío).

	Observación	
Carnerillo	Testículos	Epidídimos
1	----------	simétricos
2 Control	----------	epididimitis derecha
3	----------	epididimitis izquierda
4	----------	epididimitis derecha
5 Grupo 1	atrofia derecha	epididimitis izquierda
6	----------	epididimitis izquierda
7	atrofia izquierda	epididimitis derecha
8 Grupo 2	----------	epididimitis derecha
9	atrofia izquierda	epididimitis izquierda

5.2. Resultados de medición cutimétrica:
En el Cuadro 4 se muestran los resultados de las mediciones cutimétricas (mm), realizadas a los carnerillos, previo a la inoculación de extracto proteico de RB51 y 72 horas mas tarde

CUADRO 4

Resultados de la medición cutimétrica (mm), de los carnerillos 1,4 y 9.

Carnerillo	Pre inoculación Día 47	Post inoculación Día 49
1 Control l	35	36
4 Grupo 1	31	31
9 Grupo 2	26	85

Los resultados obtenidos post-inoculación (49 días después de la primera vacunación), muestran un aumento de grosor cutáneo en el carnerillo 9.

5.3. Análisis serológico:

Las pruebas de Inmuno Difusión en Gel (IDG). Rosa de Bengala (RB) y Rivanol (Riv), para las muestras obtenidas el día 0 (previo a la primera vacunación), día 20 (posterior a la primera vacunación y previo a la segunda vacunación), día 94 (posterior a vacunaciones y previo a los desafíos) y día 176 (posterior a vacunaciones y desafíos). mostraron los siguientes resultados:

CUADRO 5

Resultados de pruebas de IDG, RB y Rh, realizadas a los sueros sanguíneos obtenidos los días 0,20,94 y 176.

	SUEROS								
	Día 0		Día 20		Día 94		Día 176		
Carnerillo	IDG	RB	IDG	RB	IDG	RB	IDG	RB	Riv
1	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2 Control	-	-	-	-	-	-	+	-	-
3	-	-	-	-	-	-	+	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5 Grupo 1	-	-	+	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	
8 Grupo 2	-	-	-	-	-	-	-	+	+
9	-	-	-	-	-	-	-	-	

(-): Negativo.
(+): Positivo.

Día 0 : previo primera vacunación.
Día 20 : posterior a la primera vacunación y previo a la segunda vacunación.
Día 94 : posterior a la primera y segunda vacunación, previo al primer desafío.
Día 176 : posterior a la primera y segunda vacunación y desafíos.

5.4. Análisis bacteriológico:

Los frotis de las muestras de mucosa peneana, obtenidas el día 97 posterior a la primera vacunación (3 días después del primer desafío). fueron negativas a la tinción de Boddie

Esta misma tinción al semen de los carnerillos. en muestras obtenidas el día 157 del experimento (63 días después del primer desafío) y, los frotis con tinción de Boddie realizado al las colonias sospechosas de los cultivos de semen, se expresa en el Cuadro 6

CUADRO 6

Resultados de la tinción de Boddie en semen fresco y frotis de cultivo de semen.

Carnerillo	Boddie semen	Cultivo	Boddie cultivo
1	+	desarrollo	+
2 Control	+	sin desarrollo	
3	-	desarrollo	-
4	-	desarrollo	-
5 Grupo 1	-	sin desarrollo	
6	+	desarrollo	-
7	-	sin desarrollo	
8 Grupo 2	-	desarrollo	-
9	-	sin desarrollo	

(-) : Negativo.
(+) : Positivo.
Desarrollo: Crecimiento de colonias.

Los resultados de los frotis (tinción de Boddie) de lesiones de epidídimos y de estromas testiculares, realizados inmediatamente después de la castración se muestran en el Cuadro 7.

CUADRO 7

Resultados de la tinción de Boddie de lesiones de epidídimos y estroma testiculares.

		Testículo		Epidídimo	
Carnerillo		Izq.	Der.	Izq.	Der.
1		-	+	-	+
2	Control	-	-	-	-
3		-	-	+	+
4		-	-	-	+
5	Grupo 1	-	-	-	-
6		-	-	-	-
7		-	-	+	-
8	Grupo 2	-	-	+	+
9		-	-	-	-

(-): Negativo.
(+): Positivo.

Los resultados de los cultivos de lesiones de epidídimos y tinción de Boddie, de sus respectivos frotis, se muestran en el Cuadro 8

CUADRO 8

Resultados de los cultivos de lesiones y tinción de Boddie de frotis de epidídimos.

		Boddie epidídimos	
Carnerillo	Cultivo	Izq.	Der.
1	sin desarrollo	-	-
2 Control	sin desarrollo	-	-
3	desarrollo	+	+
4	desarrollo	-	+
5 Grupo 1	desarrollo	+	+
6	sin desarrollo	-	-
7	desarrollo	+	+
8 Grupo2	sin desarrollo	-	-
9	desarrollo	-	-

(-) : Negativo.
(+) : Positivo.
Desarrollo: Crecimiento de colonias.

Las cepas con características coloniales de *Brucella,* dieron la siguiente respuesta a las pruebas identificatorias (Cuadro 9).

CUADRO 9

Resultados de las pruebas identificatorias de las cepas de los carnerillos 3,5 y 7.

Carnerillo	Boddie	Urea	Crecimiento		Oxidasa	Catalasa
			O_2	CO_2		
3	+	+	+	+	+	+
5	+	-	-	+	+	+
7	+	-	-	+	+	+

Con estos resultados la cepa del carnerillo 3 correspondería a *Brucella abortus* y los carnerillos 5 y 7 a *Brucella ovis* (Anexo 5). De los restantes carnerillos no fue posible aislar *Brucella.*

5.6. Análisis anatomopatológico:

La disección de testículos y epidídimos revelo la presencia de abscesos de diferentes tamaños en todos los epidídimos, incluidos los controles. La ubicación fue variada encontrándose en cola cuerpo y cabeza de epidídimo, observándose principalmente en la cola de los epidídimos. El pus tenia consistencia liquida o caseosa, siendo la primera forma la mas observada.

El examen anatomopatologico[4], realizado al testículo izquierdo del carnerillo 9. por presentar las mayores lesiones, diagnosticó orquitis purulenta crónica de carácter moderado y severa epididimitis purulenta crónica (Anexo 6).

[4]. Examen realizado por el Instituto de Anatomía Patológica de la Universidad Austral de Chile.

Figuras 1, 2 y 3.

Fotografías de lesiones de testículos y epidídimos de carnerillos 1,2 y 3. (D: derecho; I: izquierdo).

E: Epididimitis.
A: Atrofia.
D: Adherencias.

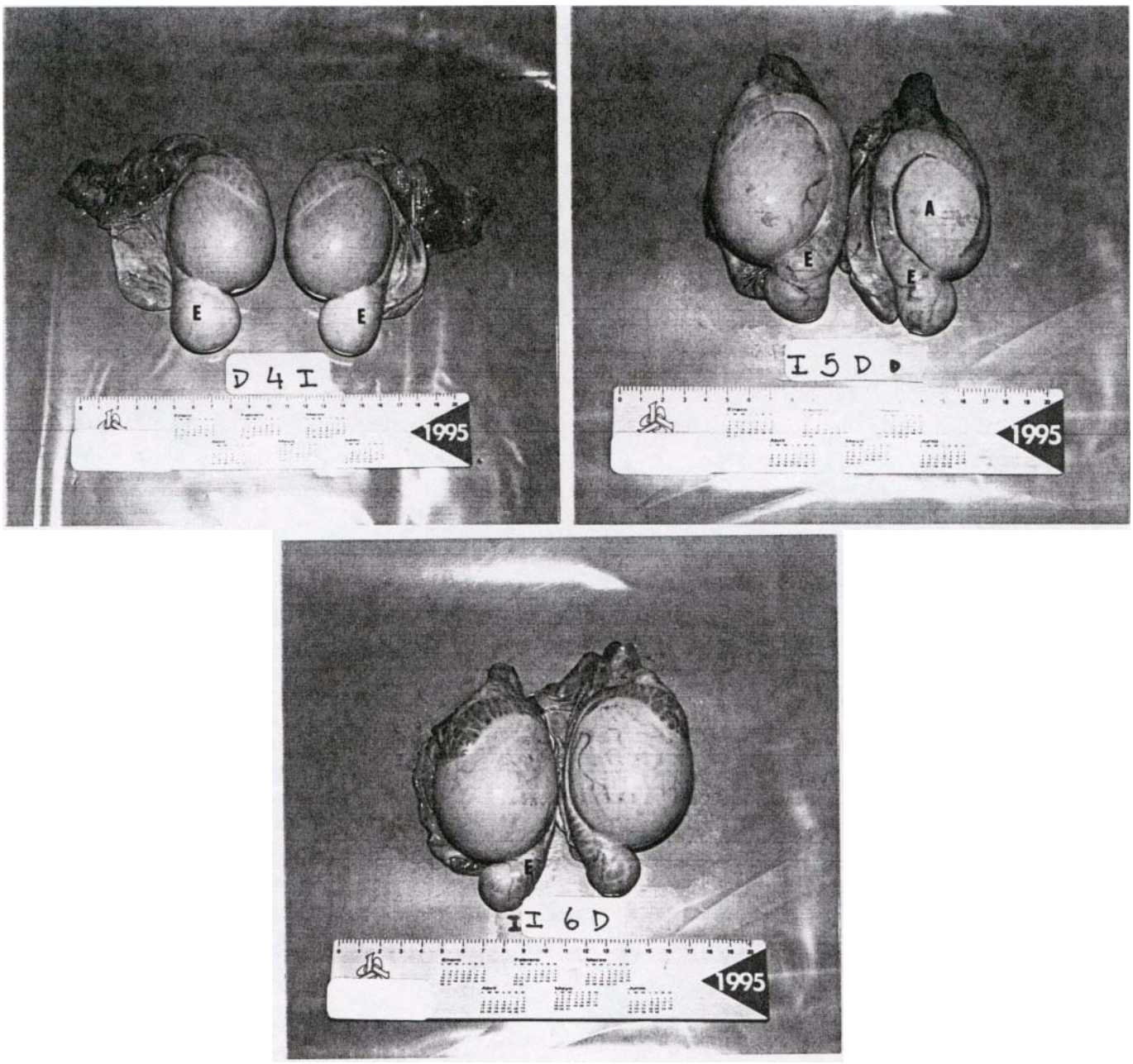

Figura 4, 5 y 6.

Fotografías de lesiones de testículos y epidídimos de carnerillos 4, 5 y 6. (D: derecho; I: izquierdo).

E: Epididimitis.
A: Atrofia.
D: Adherencias.

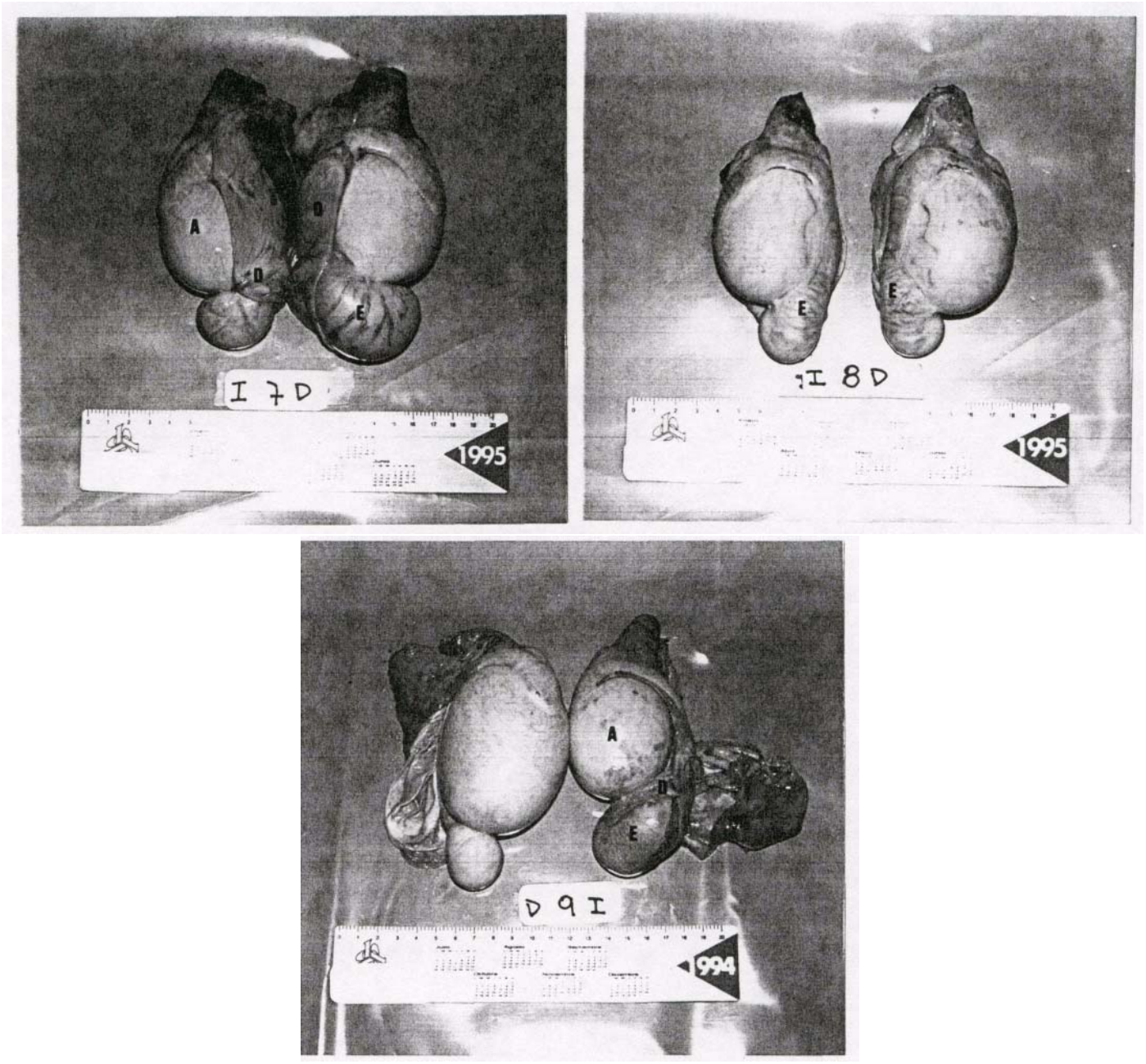

Figura 7, 8 y 9.

Fotografía de lesiones de testículos y epidídimos de carnerillo 7, 8 y 9. (D: derecho; I: izquierdo).

E: Epididimitis.
A: Atrofia.
D: Adherencias.

EXPERIMENTO 2

5.7. Evaluation clínica:

Los carnerillos no presentaron variaciones, en las primeras cinco evaluaciones, de sus diámetros testiculares como tampoco cambios o alteraciones palpables de epidídimos.

Las lesiones de epidídimos se hicieron evidentes a partir de la séptima medición (6 días después del desafío), e inicialmente se aprecio sólo consistencia firme de las colas de los epidídimos izquierdos Los carnerillos afectados fueron el 5. 6, 7. 8 y 9.

Desde la octava evaluación (10 días posterior al desafío) hasta la décima (25 días posterior al desafío), las lesiones se hicieron evidentes en todos los carnerillos, a excepción del carnerillo 1. Se aprecio consistencia firme mas aumento de tamaño de la cola de los epidídimos izquierdo, asociado a disminución de diámetro testicular.

No tuvieron variaciones de diámetro testicular los carnerillos 1 y 7. referido a la diferencia entre la primera y ultima medición. Además, en el carnerillo 6 se aprecio un leve aumento de su diámetro testicular (Anexo 7).

En el grafico 2 se presentan los promedios por grupo de las mediciones de diámetro testicular de los carnerillos.

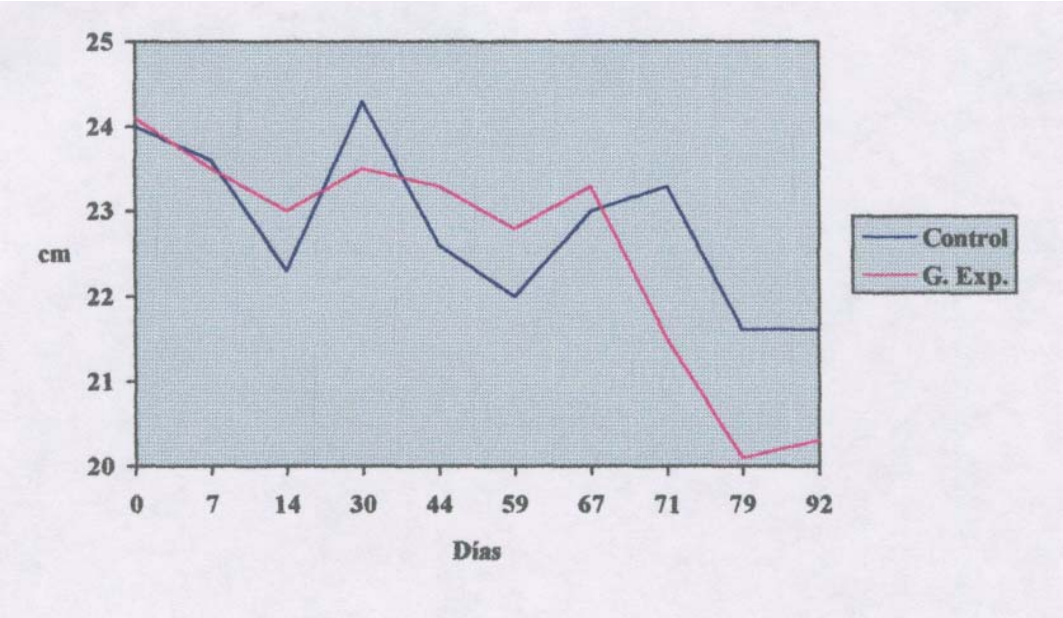

GRAFICO 2

Promedios de mediciones (cm) de diámetro testicular por grupos, obtenidas los días 0, 7, 14, 30, 44, 59, 67, 71, 79, 92 del experimento 2.

El grafico 2 muestra que los carnerillos del grupo control tanto como los carnerillos vacunados en dos ocasiones tuvieron disminución de su diámetro testicular, observándose desde la octava medición (10 días después del desafío).

El Cuadro 10, muestra las lesiones encontradas a nivel de epidídimos 31 días después del desafío (día 92):

CUADRO 10

Lesiones en epidídimos encontradas a la palpación presión, 31 días después del desafió.

Carnerillo		Observación
1		leve aumento de volumen de epidídimo izquierdo.
4	Control	aumento de volumen de cola de epidídimo izquierdo.
5		aumento de volumen de cola y cabeza de epid. izquierdo.
7	G. exp.	aumento de volumen de cabeza y cola epid. izquierdo
2		aumento de volumen de cola de epidídimo izquierdo
3		aumento de volumen de cola de epidídimo izquierdo
6	G. exp.	aumento de volumen de cola de ambos epidídimos
8		aumento de volumen de cabeza y cola de epid. izquierdo.
9		aumento de volumen de cola de epidídimo izquierdo

5.8. Análisis serológico:

Las pruebas de Inmuno Difusión en Gel (IDG) y Rosa de Bengala (RB), de las muestras obtenidas el día 0 (previo a la primera vacunación), día 14 (posterior a la primera vacunación y previo a la segunda vacunación), día 61 (posterior a las vacunaciones y previo al desafío), día 88 (posterior a vacunaciones > desafío). y día 110 (posterior a vacunaciones y desafío), mostraron los siguientes resultados

CUADRO 11

Resultados de pruebas de IDG, RB, realizadas a los sueros sanguíneos obtenidos los días 0, 14, 61, 88 y 110.

	SUEROS									
Camerillo	Día 0		Día 14		Día 61		Día 88		Día 110	
	IDG	RB	IDG	RB	IDG	RB	IDG	RB	IDG	RB
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4 Control	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
5	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
7 G. exp.	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
6 G. exp.	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
8	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

(-): Negativo
(+): Positivo

Día 0: previo a la primera vacunación.
Día 14 : posterior a la primera vacunación y previo a la segunda vacunación.
Día 61 : posterior a la primera y segunda vacunación, previo al desafío.
Día 88 : posterior a la primera y segunda vacunación y posterior al desafío.
Día 110: posterior a la primera y segunda vacunación y posterior al desafío.

5.9. Análisis microbiológico:
Solo se obtuvieron dalos de los frotis de las lesiones de testículos y epidídimos.

No hubo crecimiento de los cultivos de lesiones de epidídimos y estroma testicular.

CUADRO 12

Resultados de la tinción de Boddie,
de lesiones de epidídimos y estroma testicular.

	Testículo		Epidídimo	
Carnerillo	Der.	Izq.	Der.	Izq.
1	-	-	-	-
4 Control	-	-	+	+
5	-	-	+	-
7 G. exp.	-	-	-	-
2	-	-	+	+
3	-	-	-	-
6 G. exp.	-	-	+	-
8	-	-	-	-
9	-	-	+	-

5.10. Análisis anatomopatológico:
La castración se realizó 49 días posterior al desafío. La disección de testículos y epidídimos reveló la presencia de abscesos de diferentes tamaños, ubicados principalmente en la cola de los epidídimos, con pus de características caseosas y calcificaciones. Los carnerillos 1 y 3, no presentaron abscesos ni lesiones microscópicas evidentes en epidídimos y testículos.

El Cuadro 13 resume las observaciones de testículos y epidídimos después de la disección (corte longitudinal).

CUADRO 13

Observación de testículos y epidídimos (corte longitudinal).

	Observación		
Carnerillo	Testículo	Der.	Izq.
1	----------	sin alteración (*)	
4 Control	----------	absceso cola epidídimo izquierdo.	
5	----------	absceso cola epidídimo izquierdo.	
	----------	adherencias de túnica.	
7 G. exp.	----------	absceso cola epidídimo izquierdo.	
2	----------	absceso cola epidídimo izquierdo.	
3	----------	sin alteración (*)	
6 G. exp.	----------	absceso cola epidídimo izquierdo.	
8	----------	absceso cola epidídimo izquierdo.	
9	----------	absceso cola epidídimo izquierdo.	

(*): Sin alteraciones microscópicas evidentes.

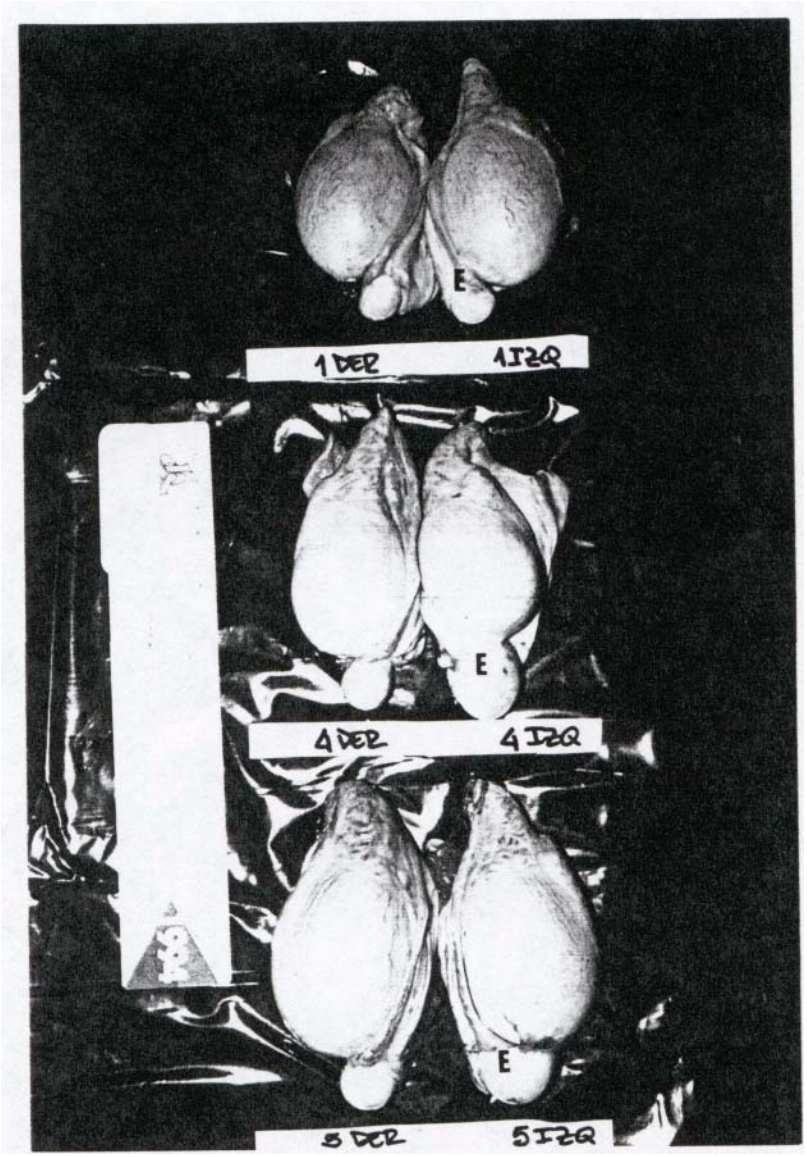

Figura 10.

Fotografías de lesiones de testículos y epidídimos de carnerillos 1, 4 y 5. (DER.: derecho; IZQ.: izquierdo).

E: Epididimitis
A: Atrofia
D: Adherencias.

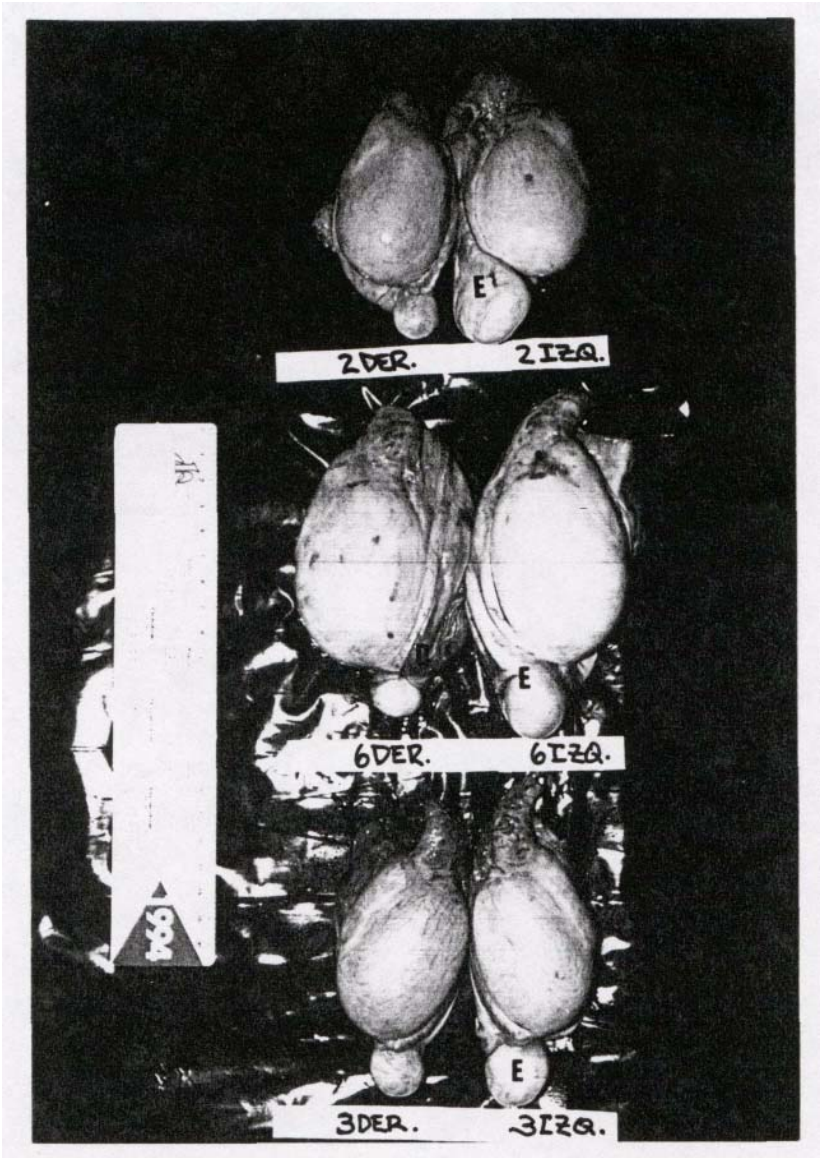

Figura 11.

Fotografías de lesiones de testículos y epidídimos de carnerillos 2, 6 y 3. (DER.: derecho; IZQ.: izquierdo).

E: Epididimitis
A: Atrofia
D: Adherencias.

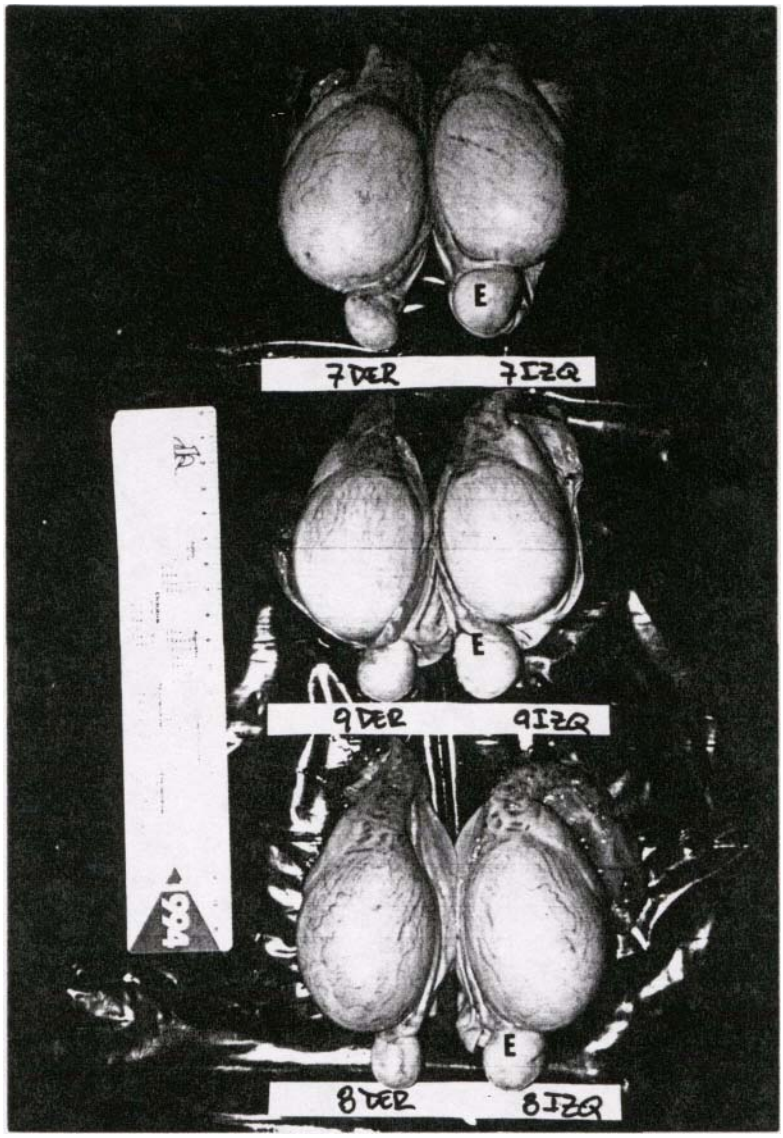

Figura 12.

Fotografías de lesiones de testículos y epidídimos de carnerillos 7, 9 y 8. (DER.: derecho; IZQ.: izquierdo).

E: Epididimitis
A: Atrofia
D: Adherencias.

6. DISCUSION

Si bien es cierto la cepa RB51 ha sido probada en bovinos y en animales de experimentación con bastante éxito, una mirada general de los resultados obtenidos en los dos experimentos realizados, se desprendería que no hubo diferencias entre los carneros no vacunados y vacunados con la cepa RB51.

Como se aprecia en los exámenes clínicos y anatomopatológicos, con la excepción del carnerillo 6 del segundo experimento, hubo disminución de diámetros testiculares y presencia de abscesos en los epidídimos, ubicados principalmente en la cola de estos. Las lesiones de epidídimos comenzaron a presentarse a los 21 días, posterior al primer desafío, en el primer experimento y en el segundo experimento a los 6 días posterior al desafío. Al respecto. Plant y col, (1986), observaron que las lesiones palpables de los epidídimos se encontraban a partir de la 4^a a 5^a semana después de una infección con *B ovis* via intraprepucial. La situación observada, excepto para el carnerillo 6 del segundo experimento que tuvo un leve aumento de diámetro testicular, coincide con lo señalado por Burgess y col (1982) y Thoen y Enright (1986), quienes indican que la presencia de epididimitis y atrofia testicular, son manifestaciones del cuadro de epididimitis causada por *B. ovis.*

La colonización de *B. ovis,* luego de la inoculación con concentraciones infectantes de 5×10^8 y 1×10^9, (primer y segundo experimento respectivamente) tanto como las vías de inoculación (intraprepucial e inyección directa en epidídimo izquierdo), tendrían relación directa con la génesis del cuadro. En este sentido Blasco (1990), describe que la dosis de 5×10^8 UFC de *B. ovis,* es suficiente para obtener porcentajes de infección cercanos a 100% en carneros. Weeb (1980) al inocular carneros con dosis de $1{,}65 \times 10^8$ intraprepucial produjo epididimitis. Entre las vías de inoculación experimental, la conjuntival e intraprepucial dan los mejores resultados en la colonización de este microorganismo (Plant y col, 1986).

Las lesiones anatomopatológicas observadas en el primer experimento, fueron mas difusas y de mayor agresividad que en los carnerillos del segundo experimento, en los cuales se localizaron sólo en la cola de los epidídimos izquierdos (Cuadro 10, Anexo 4). Este hallazgo también se relacionaría con las dosis infectantes como a las vías de inoculación utilizadas. En el segundo experimento la presentación de lesiones pudo estar favorecida por el daño físico producido por la inyección directa al epidídimo, y es posible suponer que la reacción inflamatoria producida por la inyección tanto como la reacción ante el antígeno *(B. ovis),* favorecieron la presentación de las lesiones antes y mas localizadas, en relación a los carnerillos del primer experimento (Cuadro 13).

En relación a la prueba cutimétrica, realizada a los carnerillos del primer experimento, la mayor reacción fue presentada por el carnerillo 9, el cual fue vacunado en dos ocasiones en concentraciones de 10×10^9 y $4{,}5 \times 10^8$ de la cepa RB51 (Cuadro 4). Esta reacción correspondería a una respuesta celular mononuclear ante un antígeno, en este caso a fracciones de proteínas de la cepa RB51, consecuencia de la interacción del antígeno inyectado y los linfocitos T sensibilizados. Este tipo de respuestas (hipersensibilidad tardía) produce vasodilatación y aumento de permeabilidad vascular y como consecuencia se observa eritema y tumefacción, donde ocurre infiltración de células mononucleares (macrófagos y linfocitos) a diferencia de la respuesta inflamatoria aguda clásica (Tizard, 1989).

Respecto a las pruebas serológicas realizadas para detectar anticuerpos a cepas lisas, Rosa de Bengala y Rivanol, ellos se basan en la detección de anticuerpos específicos producidos por la cadena O que es parte de la molécula de lipopolisacárido de la pared celular, presente sólo en la cepas lisas de *Brucella* el cual corresponde al antígeno inmunodominante (Cherwonogrodsky y col, 1990). En cambio. el diagnostico serológico de B. *ovis,* se basa en la detección de anticuerpos específicos, reaccionantes a los antígenos presentes en la pared bacteriana correspondiente a lipopolisacáridos de superficie (LPS rugoso de *B. ovis)* (Blasco. 1990) Como tanto la cepa infectante como la vaccinal eran rugosas, el resultado esperado era de negatividad para las pruebas de Rosa de Bengala y Rivanol.

Sin embargo, los resultados de las pruebas serológicas (Cuadros 5 y 11), muestran presencia de anticuerpos a cepas lisas en el suero del carnerillo 8 del primer experimento.

Al respecto cabria la hipótesis de una reversión de la cepa RB51, ya que siendo una mutante rugosa de *B. abortus* 2308, podría ser la responsable de desarrollar anticuerpos a cepas lisas, siempre y cuando se hubiese inducido en ella la génesis del antígeno inmunodominante, cadena O. Sin embargo, esto se contrapone a las características de estabilidad descritas por Schurig y col (1995) para la cepa RB51 La posibilidad de infección natural con la cepas lisas de *Brucella* queda absolutamente descartada por el estado de confinamiento y aislamiento de los carnerillos. La otra cepa utilizada *(B. ovis)* es rugosa en origen y tampoco se le han descrito reversiones a la fase lisa (Blasco, 1990).

Por su parte, serológicamente los animales respondieron ante la infección desarrollando anticuerpos anti *B.ovis,* como lo demuestra la IDG (Cuadros 5 y 11). Los reaccionantes positivos antes de ser infectados podría corresponder a reacciones individuales ante la cepa RB51.

Se describe que la infección masiva de RB51 produce energía. A ello podrían atribuirse tanto los IDG negativos como la baja protección de la cepa La cepa RB51 al ser capaz de inducir una respuesta inmune celular, lleva implícito que el inmunógeno una vez procesado inhibe las células ayudadoras de la respuesta inmune humoral (Schweitzer, 1994).

Estudios experimentales realizados por Burgess y col., (1982), observaron que también carneros infectados con *B. ovis* revirtieron a un estado serológico negativo después de 130 días de la infección. Searson (1986 a y b), observe que carneros infectados experimentalmente no desarrollaron títulos altos de anticuerpos. Este estado anérgico, debido a sobreestimulación con el antígeno, es bastante conocido y como tal lo describe Tizard(1989).

En relación a la detección directa de *Brucella,* la tinción de Boddie positiva desde eyaculado, el cultivo de semen y lesiones de epidídimo, es suficiente para confirmar su presencia (Hughes y Claxton. 1976; Zamora y col., 1977). Los resultados microbiológicos, referidos a esta tinción en el primer experimento, muestran que de todos los carnerillos se obtuvo resultados positivos al menos una vez, a excepción del carnerillo 9 (Cuadros 6, 7 y 8, Anexo 8). En el segundo experimento sólo se obtuvieron resultados parciales (Cuadro 12).
Se sabe que la liberación de *B. ovis* por el semen es intermitente, disminuyendo a medida que el cuadro se hace crónico (Hughes y Claxton, 1976; Rahaley y Dennis, 1984). También se describe que la excreción de *B. ovis* desde el semen no ocurre en todos los animales infectados (Burgess y col, 1982). Esto explicaría la presencia del microorganismo sólo en algunos frotis de semen, además de que toda observación microscópica es subjetiva, ya que se limita a la revisión de campos microscópicos (Alton y col, 1988).

Sin embargo, los resultados bacteriológicos y de tinción son indicativos de que ocurrió colonización con *Brucella* en los genitales de los cameras vacunados y no vacunados. El aislamiento de *B.* ovis de los carnerillos 5 y 7 del primer experimento indicaría que la protección vaccinal no se produjo o que fue insuficiente y en el carnerillo 3 indicaría colonización de la cepa vaccinal (Cuadro 9, Anexo 5).

La escasa efectividad de la cepa RB51, ante una infección experimental con *B. ovis,* supondría que no es una buena productora de inmunidad en ovinos, contrariamente a investigaciones que avalan su carácter protectivo basado en inmunidad celular en la especie bovina, frente a infección por cepa lisas (Folch y col, 1995; Schurig y col, 1995; Villamil y col, 1995), como se menciono anteriormente.

También existen estudios en ratones, donde se han utilizado fracciones proteicas de la cepa RB51, los cuales también inducen la respuesta inmune celular (Schweitzer, 1994; Gómez y col., 1995; Stevens y col., 19%). Igualmente se ha demostrado protección por la cepa RB51 aplicada como suspensión celular en ratones, generando efecto protectivo que aunque menor que el de la cepa 19, es efectiva contra infección con *B. abortus* (Jorquera, 19%).

El conjunto de los resultados clínicos, anatomopatológico, serólogicos y bacteriológicos, son claros en determinar que ocurrió colonización por parte de la cepa infectante y por tanto epididimitis y atrofia testicular. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula planteada para estos experimentos.

Sin embargo, para afirmar en forma más concluyente la utilidad de esta cepa como vacuna para *B. ovis,* en futuros trabajos podría determinarse que concentraciones de la cepa RB51 estimulan una mayor respuesta inmune celular en ovinos, ante pruebas de desafío con concentraciones crecientes de la cepa infectante. Así mismo, habría que cautelar el riesgo de reversión, siendo una alternativa la inoculación experimental genital en macho y hembras de la especie ovina.

7. CONCLUSIONES

- Se acepta la hipótesis nula, ya que las concentraciones utilizadas como vacuna de la cepa RB51, no tuvieron acción protectiva frente al desafío experimental

- La cepa RB51 utilizada en dos concentraciones (10x 10^9 y 4,5x 10^8), estimuló la respuesta del sistema inmune celular, determinada a través de la prueba cutimétrica.

8. BIBLIOGRAFIA

ALTON. G.G ; L.M, JONES; ANGUS. R.D. y VERGER, J.M. 1988. Techniques for the Brucellosis Laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique Paris.

BAGLEY. C.V ; BURREL. W.C.; ESPLIN, G.M. y WALTERS, J.L. 1984. Effects of epididymitis on semen quality of rams. J A M V A. 185: 876-877.

BLASCO, J.M.; MARIN. C.M.; BARBERAN. M.; MORIYON. I. y DIAZ, R. 1987 Immunization with **Brucella melitensis** Rev. 1 against **Brucella ovis** infection of rams. Vet. Microbiol. 14: 381-392.

BLASCO. J. 1990. Brucella ovis. En. Animal brucelosis. Nielsen and Duncan Editors. CRC Press. Boca Ratón Florida.

BUDDLE, M.B.; CALVERLEY, F.K. y BO YES, B.W. 1963. **Brucella ovis** vaccination of rams. N. Z. Vet. J. 11: 90.-93.

BURGESS. G.W.; McDONALD, J.W. y NORRIS. J.M. 1982. Epidemiological studies on bovine brucellosis in select ram flocks. Aust. Vet. J. 59: 45-47.

CHERWONOGRODSKY,J.M.;DUBRAY, G.; MORENO, E.y MAY, H. 1990. Antigens of Brucella En: Nielsen, K. y Duncan. R. 1990. Animal brucelosis. CRC Press. Boca Ratón. Florida.

ENRIGHT, F.M; WALKER. J.; BUHRMAN, D. y SCHURIG, G.G. 1994. **Brucella abortus** strain RB51: a better bovine brucellosis accine. Louisiana Agric. 37: 11-15.

FAO/OMS. 1986. Comité mixto FAO/OMS de expertos en brucelosis. Sexto Informe. Ginebra.

FOLCR H.; ROJAS. X.; OÑATE. A.; ALONSO. O.; LEYAN, V. y JARA, U. 1995. Humoral and cellular response in calves vaccinated with **Brucella abortus** RB51. Arch. Med. Vet. 27: 125-130.

GOMEZ, P.H.; RUEDA. E.; GALLEGO, I.; VTLLAMIL, V. y MARINO. O.C. 1995. Mecanismos de protección inducidos por proteínas de membrana externa de **Brucella abortus cepa RB51**. Arch. Med. Vet. 27: 65-75.

HERVE, M. 1991. Apuntes de Zootecnia General. Inst. Zootecnia Fac. Ciencias Veterinarias. UACH. Valdivia

HUGHES, K.L. 1972. Experimental Brucella ovis infection in ewes. Aust. Vet. J. 48: 12-17.

HUGHES. K.L. y CLAXTON, P.O. 1976 **Brucella ovis** infection I.: An evaluation of microbiological, serological and clinical methods of diagnosis in the ram. Aust Vet. J. 44: 41-50.

INE. 1994. Estadísticas Agropecuarias Año Agrícola 1993-1994

JENSEN. R y B.L. SWIFT. 1988. Jensen and swift's diseases of shepp. Ed.: Lea and Febiger. 3 ª Edici6n. Filadelfia.

JIMENEZ DE BAGUES. M.P.: ELZER. PH.; JONES. S.M.: BLASCO. J.M.: SCHURIG. G G y WINTER. A.J. 1994. Vaccination with **Brucella abortus** rouht mutant RB51 protecs BALB / c mice against virulent strain of **B. abortus. B. melitensis and B. ovis** Infect. Immun. 62: 4990-4996.

JORQUERA, A 1996 Determinación de la respuesta humoral y evaluación de la protección conferida ratones inmunizados con **Brucella abortus** cepa 19, RB51 y cadena O. Tesis, M.V. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias. Valdivia, Chile.

McGOWEN. B. and HARROLD. D.R 1979. Epididymitis in rams: studies on vaccine efficacy. Cornell Vet. 69: 73-77.

PINOCHET, L.; M.L SANCHEZ y P. ABALOS. 1981. Brucelosis. Monogr. Med. Vet. 3: 44 - 80.

PINOCHET, L 1985. Sinopsis histórica de la brucelosis en Chile. Memorias del II Seminario de Brucelosis. Valdivia, Chile.

PLANT. J.W.; EAMENS. GJ. y SEAMAN. J.T. 1986 Serological. bacteriological and pathological changes in rams following different routes of exposure to **Brucella ovis.** Aust. Vet. J. 63: 409-411.

RAHALEY, R.S. y DENNIS, S.M. 1984 Histopathology of experimental brucellosis in rams following vaccination with **Brucella ovis.** Aust. Vet. J. 61: 353-356.

ROJAS. X ; O. ALONSO; C. ROSENFELD; C. URIBE; V FERNANDEZ y N. TADICH. 1990. Brucelosis ovina:. Situación actual en explotaciones pequeñas de una comuna del sur de Chile Arch. Med. Vet. 22: 55-63.

ROJAS, X. 1991. Brucelosis ovina En: Medicina Preventiva de Rebaños ovinos II. Editado por N. Tadich. Gráfica Sur. Valdivia, Chile.

SAG. 1970. Decreto 168. Estable el control de la distribución, venta y aplicación de la vacuna cepa 19. Servicio Agrícola y Ganadero. Chile.

SCHURIG, G,G.; ROOP, R,M; BAGCHI, T.; BOYLE, S; BUHRMANN, D. y SRIRANGANATHAN, N. 1991. Biological properties of RB51:a estable rough strain of **Brucella abortus.** Vet. Microbiol. 28: 171-188.

SCHURIG, G.G.; BOYLE, S. y SRINANGANATHAN, N. 1995. **Brucella abortus** vaccine strain RB51: a brief review. Arch. Med. Vet. 27: 19-22.

SCHWEITZER, E. A. 1994. Respuesta blastogénica de linfocitos de ratón a antígenos de **B. abortus RB51.** Tesis, Bioquímica. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias. Valdivia, Chile.

SEARSON. J.E. 1986a. Distribution of **Brucella ovis** in the tissues of rams reacting in a complement fixation test for ovine brucellosis. Aust. Vet. J. 63: 30-31.

SEARSON. J. E 1986b The distribution of histopathological reacting in a complement fixation test for **Brucella ovis** Aust. Vet. J. 64: 108-109.

STEVENS. M.G.: OLSEN. S C y CHEVILLE. N.F. 1996. Lymphocyte proliferation in response to **Brucella abortus** RB51 and 2308 proteins in RB51-vaccinated or 2308-infected cattle Infect. Immun. 64: 1007-1010.

THOEN. C.O y F. ENRIGHT. 1986 Brucella, in pathogenesis of bacterial infections in animals Gyles, G.L. and Thoen. C.O. Eds. Iowa State University Press. Ames. chap. 20. En: Animal Brucellosis. Nielsen and Duncan Editors. CRC Press. Boca Ratón. Florida

TIZARD. I. 1989. Inmunologia Veterinaria 3 [a] Edición. Editorial Interamericana Mc Graw-Hill.

VILLAMIL, M; E. RUEDA; 1. GALLEGO.; O.C. MARIÑO y A. GUTIERREZ de GERARDINO. 1995 Respuesta inmune humoral y celular en cobayos inmunizados con proteínas de membrana externa de **Brucella abortus** cepa RB51. Arch. Med. Vet. 27: 77-84.

WEBB. R.F.; QUINN. C.A.; COCKRAM, F.F. y HUSBAND, A.J. 1980. Evaluación of procedures for the diagnosis of **Brucella ovis** infection in rams Aust Vet. J. 56: 172-175.

ZAMBRANO, A.J.; VILLANA, F.M; SCHURIG. G.G. y CHERWONOGRODZKY. J.W. 1995. Preliminary results for the vaccination of pregnant cattle with **Brucella abortus** strain 19 or **B. abortus** RB51. Arch Med. Vet. 27: 119-123.

ZAMORA. J.: CHAHUAN. E.; POLETTE, M.; ALONSO. O.: ROJAS, *X.:* KRUZE. J. y HERVE, M. 1977. **Brucella ovis** y otros agentes etiológicos en epididimitis y orquitis infecciosa ovina. Arch. Med. Vet. 9: 94-99.

9. ANEXOS

1. Esquema cronológico de actividades realizadas en el experimento 1.

Días	Actividad
Día 0	Obtención de suero; primera medición; primera vacunación
Día 20	Obtención de suero; segunda vacunación.
Día 47	Medición cutimétrica
Día 94	Obtención de suero; primer desafío; segunda medición.
Día 97	Segundo desafío; muestra de mucosa.
Día 103	Tercer desafío; tercera medición.
Día 115	Cuarta medición.
Día 157	Electroeyaculación
Día 161	Quinta medición.
Día 176	Obtención de suero.
Día 179	Castración

2. Esquema cronológico de actividades realizadas en el experimento 2.

Días	Actividad
Día 0	Obtención de suero; primera medición; primera vacunación.
Día 7	Segunda medición.
Día 14	Obtención de suero; tercera medición extracción de sangre; Segunda vacunación.
Día 30	Cuarta medición.
Día 44	Quinta medición.
Día 59	Sexta medición.
Día 61	Obtención de suero; desafío.
Día 67	Séptima medición.
Día 71	Octava medición.
Día 79	Novena medición.
Día 88	Obtención de suero.
Día 92	Décima medición.
Día 110	Obtención de suero; castración

3. Diámetros testiculares (en centímetros) de los carnerillos, obtenidos los días 0, 94, 103, 115 y 161 del experimento 1.

Carnerillo		a	b	c	d	e	Promedio	DS
1		40	39	40	36	32	37,4	3,45
2	Control	34	34	34	31	29	32,4	2,30
3		39	38	39	35	29	36	4,24
4		35	34	36	32	30	33,4	2,40
5	Grupo 1	39	38	38	34	28	35,4	4,56
6		35	36	36	33	30	34	2,54
7		38	38	37	34	31	35,6	3,04
8	Grupo 2	40	41	42	36	28	37,4	5,72
9		40	39	40	36	34	37,8	2,68

a (Día 0) : 1 [a] Medición antes de vacunaciones.
b (Día 94) : 2 [a] Medición 94 días después de la primera vacunación.
c (Día 103) : 3 [a] Medición 9 días después del primer desafío.
d (Día 115) : 4 [a] Medición 21 días después del primer desafío.
e (Día 161) : 5 [a] Medición 67 días después del primer desafío.

4. Observación macroscópica de testículos y epidídimos (corte longitudinal), de los carnerillos del experimento 1.

Carnerillo	Observación
1	Pequeños acúmulos de pus en cola de ambos epidídimos.
2 Control	Absceso en cola y cuerpo de epidídimo derecho.
3	Absceso en cola de epidídimo izquierdo. Pequeños acúmulos de pus en epidídimo derecho.
4	Pequeños acúmulos de pus en cola de ambos epidídimos.
5 Grupo 1	Absceso en cabeza de epidídimo izquierdo. Adherencias de túnica albugínea de epidídimo derecho, asociado a disminución de tamaño testicular.
6	Absceso en cola de epidídimo izquierdo.
7	Adherencias de túnica albugínea. Absceso de gran tamaño en cola y presencia de pus en cabeza y cuerpo de epidídimo derecho. Acúmulos de pus en cuerpo de epidídimo izquierdo, disminución de tamaño testículo izquierdo.
8 Grupo 2	Abscesos en cabeza de ambos epidídimos.
9	Pequeños abscesos en cola de epidídimo derecho. Absceso de gran tamaño en epidídimo izquierdo, disminución de tamaño testículo izquierdo. Múltiples adherencias en túnica albugínea.

5. Características fisiol6gicas y bioquímicas de *B .ovis y B. abortus.*

	B. ovis	*B. abortus*
Motilidad	-	-
Esporulación	-	-
Boddie	+	+([a])
Requerimiento CO_2	+	+
Requerimiento O_2	-	-
H_2S	-	+([a])
Catalasa	+	+
Ureasa	-	+
Oxidasa	-	+([b])

([a]): algunos biotipos (-)
([b]): algunas cepas (-)
(-): no requiere de, o es negativo a la prueba.
(+): requiere de, o es positivo a la prueba.

6. Informe anatomopatológico de testículo y epidídimo de carnerillo 9 del primer experimento, realizado por el Instituto de Anatomía Patológica, Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Austral de Chile. Valdivia.

CASO: 406-407-95-E.
ESPECIE: Ovino.
FECHA: 12.07.95

PATOLOGO (S): DRS CUBILLOS Y PAREDES

HALLAZGOS HISTOPATOLOGICOS:

CASO: 406-95-E (Testículo N°9).

TESTICULO: Marcado engrosamiento difuso de la túnica albugínea. El tejido intersticial presenta moderado engrosamiento con marcada fibrosis y áreas focales de infiltrado inflamatorio no purulento. La gran mayoría de los túbulos seminíferos no presentan actividad espermática. observándose en algunos de ellos detritus celulares, células descamadas e inflamatorias (neutrófilos) con fibrina

DIAGNOSTICO: - Orquitis Purulenta Crónica de Carácter Moderado.
- Espermatogénesis Disminuida.

CASO 407-95-E (Epidídimo N°9).

EPIDIDIMO: Severo engrosamiento intersticial con proliferación de tejido conectivo, neoformación vascular, edema y abundantes células inflamatorias principalmente del tipo linfoplasmocitario. Los conductos espermárticos presentan fibrosis periférica y marcada hiperplasia epitelial con formación de microabscesos. En el lumen se observan abundantes neutrófilos y detritus celulares, además de algunos espermatozoises.

DIAGNOST1CO: - Severa Epididimitis Purulenta Crónica.

7. Diámetros testiculares (en centímetros) de los carnerillos, obtenidos los días 0, 7, 14, 30, 44, 59, 67, 71, 79, y 92, del experimento 2.

Carnerillo	a	b	c	d	e	f	K	h	i	.i	Promedio	DS
1	22	23	22	25	22	21	23	23	22	22	22,5	1.08
4 Control	22	21	20	22	20	21	21	22	20	20	20.9	0,87
5	28	27	25	26	26	24	25	25	23	23	25,2	1.61
7	24	26	25	24	26	26	26	25	24	24	25	0.94
2	25	21	22	23	21	19	23	18	18	18	20,8	2.48
3 G. exp.	23	24	23	24	23	23	21	18	18	18	21,5	2,54
6	22	26	24	25	23	23	25	24	23	23	23,8	1,22
8	25	23	23	23	25	24	23	22	18	19	22,5	2.32
9	26	21	21	22	22	22	22	22	20	20	21?8	1,68

a (día 0) : 1 ª Medición antes de vacunaciones
b (día 7) : 2 ª Medición 7 días después de primera vacunación.
c (día 14): 3 ª Medición 14 días después de primera vacunación.
d (día 30): 4 ª Medición 30 días después de la primera vacunación.
e (día 44): 5 ª Medición 44 días después de la primera vacunación.
f (día 59): 6 ª Medición 59 días después de la primera vacunación.
g (día 67): 7 ª Medición 6 días después del desafío.
h (día 71): 8 ª Medición 10 días después del desafío.
i (día 79): 9 ª Medición 18 días después del desafío.
j (día 92): 10 ª Medición 31 días después del desafío.

8. Resumen muestras positivas a tinción de Boddie, de carnerillos del experimento 1.

Carnerillo	Muestra (s) positiva (s)
1	Frotis y cultivo de semen: frotis de lesiones.
2 Control	Frotis de semen.
3	Frotis y cultivo de lesiones.
4	Frotis de lesiones.
5 Grupo 1	Frotis y cultivo de lesiones.
6	Frotis de semen.
7	Frotis y cultivo de lesiones.
8 Grupo2	Frotis de cultivo de semen y lesiones.
9	Ningún frotis positivo.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a todas aquellas personas que de una u otra forma ayudaron en la realización de esta tesis, y muy especialmente a:

Dra Ximena Rojas y Dr. Nestor Tadich, por toda su colaboración y consejos en la elaboración de este trabajo.

Sra Oriele Alonso por su aporte en el desarrollo de las técnicas de laboratorio utilizadas en esta tesis.

A los institutos de nuestra Universidad. Microbiología, Inmunología, Ciencias Clínicas Veterinarias, Zootecnia y Patotología Animal, los cuales colaboraron en el desarrollo de este trabajo.

A todos mis amigos y compañeros, por su valiosa cooperación y que en todo momento me dieron su apoyo.