

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**Aspectos de la infección de epididimitis del carnero
por *Brucella ovis* y *mellitensis***

POR

JULIO CÉSAR ESCALERA MORALES

MONOGRAFÍA

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

ASESOR

MVZ. FRANCISCO J CARRILLO MORALES

TORREÓN, COAHUILA.

MARZO 2010

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**Aspectos de la infección de epididimitis del carnero
por *Brucella ovis* y *mellitensis***

POR

JULIO CÉSAR ESCALERA MORALES

MONOGRAFÍA

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA

MARZO 2010

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**Aspectos de la infección de epididimitis del carnero
por *Brucella ovis* y *mellitensis***

POR

JULIO CESAR ESCALERA MORALES

MONOGRAFÍA

Aprobada por el

PRESIDENTE DEL JURADO

MVZ. FRANCISCO JAVIER CARRILLO MORALES

**COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL
DE CIENCIA ANIMAL**

MVZ. MC. José Luis Fco. Sandoval Elías

TORREÓN, COAHUILA

MARZO 2010

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

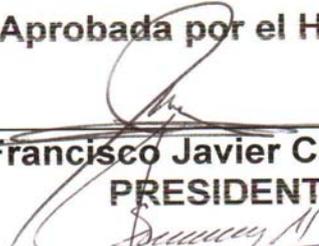
UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

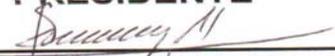


**Aspectos de la infección de epididimitis del carnero por
Brucella ovis y mellitensis**

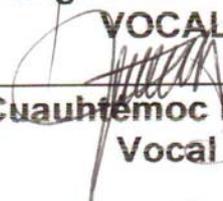
Monografía Aprobada por el H jurado examinador



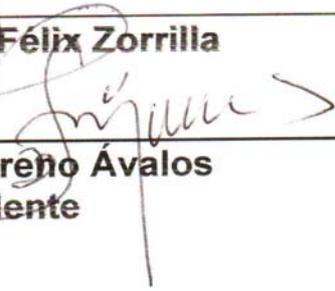
MVZ. Francisco Javier Carrillo Morales
PRESIDENTE



MVZ. Rodrigo Isidro Simón Alonso
VOCAL



MVZ Cuauhtémoc Félix Zorrilla
Vocal



MVZ. Silvestre Moreno Ávalos
Vocal Suplente

TORREÓN, COAHUILA

MARZO 2010

INDICE

Dedicatoria	I
Agradecimientos	II
Título	1
Resumen	2
Introducción	3
Antecedentes	5
Morfología	6
Estructura antigénica	7
Respuesta inmunitaria humoral y celular	9
Patogénesis	13
Aspectos clínicos	14
Patología	15
Patología macroscópica	15
Patología microscópica	15
Epidemiología	16
Transmisión natural	18
Infección artificial de ovinos con B. ovis	19
Transmisión a otras especies	19
Diagnóstico	20
Diagnóstico clínico	20
Detección del agente	20
Tinciones	20
Cultivo	21
Técnicas inmunológicas	21
Sondas moleculares de DNA	22
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	22
Detección de anticuerpos séricos	22
Prueba de fijación del complemento (FC)	23
Doble inmunodifusión en gel de agar (DDG)	23
Enzimoimmunoensayo (ELISA)	24
Otros test	24
Control	25
Diagnostico y sacrificio	25
Vacunación	26
Tratamiento	29
Referencias	30

Índice de imágenes

Foto 1	14
--------	----

DEDICATORIA

A mi madre Irene Morales por haberme apoyado a lo largo de todo este tiempo para lograr esta meta, por su apoyo incondicional y sacrificio en el transcurso de mi vida.

A mi padre César Rafael Escalera por el apoyo que me ha brindado durante los 5 años de mi carrera.

A mi esposa Angélica Aguilera por su paciencia y comprensión en los momentos más difíciles que se han presentado en estos años de mi carrera.

Para mi abuelito Rafael Escalera, mi hermano Ulises Escalera por su apoyo moral.

A mis amigos Fernando Franco y Antonio Gil.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores el M.V.Z. Francisco Carrillo Morales y al M.V.Z. Rodrigo Isidro Simon Alonso por apoyarme en este trabajo, compartiendo su tiempo, dedicación y conocimientos para la terminación de este trabajo.

Así como también a los vocales M.V.Z. Silvestre Moreno Ávalos y M.V.Z. Cuauhtemoc Félix Zorrilla.

A todos los médicos que me impartieron clases, por todos sus conocimientos y experiencias que me brindaron.

A todos ellos muchas gracias.

TÍTULO

**Aspectos de la infección de epididimitis del
carnero por *Brucella ovis* y *mellitensis***

Aspectos de la infección de epididimitis del carnero por *Brucella ovis* y *mellitensis*

RESUMEN.

La epididimitis contagiosa de los carneros por *Brucella ovis* fue reportada por primera vez en el año 1953 en Australia y Nueva Zelandia. Actualmente se encuentra ampliamente difundida en todos los países productores de ovinos. *Brucella ovis* al igual que el resto de las brucellas, penetra al huésped a través de las membranas mucosas, colonizando a partir de allí, el sistema genital.

B. ovis es una especie naturalmente rugosa; carece de la cadena O del lipopolisacárido. Las proteínas de la membrana externa han sido objeto de estudio de varios grupos de investigación por su utilidad como antígenos para el diagnóstico y en las pruebas de protección. Un extracto salino obtenido por calentamiento de *B. ovis*, posee el lipopolisacárido rugoso y varias proteínas, siendo más abundante el grupo 3 de las proteínas de la membrana externa.

Clínicamente se caracteriza por epididimitis crónica y semen de mala calidad. Las lesiones están referidas básicamente a cambios inflamatorios locales, generalmente irreversibles. La vía venérea indirecta parecería ser la forma más común de infección y difusión de la enfermedad. El diagnóstico se puede realizar a través de la detección y/o aislamiento del agente, la detección de lesiones, cambios en el semen y a través de análisis serológicos. La fijación del complemento, la inmunodifusión en gel y el ELISA son las pruebas más usadas para el control de la enfermedad se cuenta con la vacuna REV I que si bien ha demostrado ser la más efectiva, presenta algunos inconvenientes a resolver.

Existe menos información disponible respecto de los antígenos internos de *B. ovis*. Recientemente, se ha desarrollado un ELISA indirecto utilizando la proteína periplásmica BP26 con utilidad para el diagnóstico de la infección por *B. ovis*, ya que permite diferenciar los carneros infectados de los vacunados.

La identificación de los antígenos de *B. ovis* capaces de inducir una respuesta inmune protectora es de interés para el desarrollo de vacunas subcelulares que no presenten las desventajas de Rev. 1. Con ese objetivo se han desarrollado ensayos de inmunización pasiva con mezclas de anticuerpos monoclonales anti-proteínas de la membrana externa y anti-lipopolisacárido rugoso que han otorgado protección contra *B. ovis*.

Palabras clave: Reproducción - Carneros - Epididimitis - *Brucella ovis* - Ovinos.

INTRODUCCIÓN-

La brucelosis de los ovinos es una enfermedad infecciosa de curso crónico producida por *Brucella ovis*. La infección se asienta básicamente en el sistema genital, caracterizándose clínicamente en los machos por epididimitis y semen de mala calidad, *Simmons, g. c. et al., 1953, Jebson, j. I. et al., 1954. Buddle, m. b. (1956)* y en las hembras por aborto y aumento de la mortalidad perinatal *McFarlane, D.1952. Buddle, M.B.et al.,1953, Biberstein, E.I.et al., 1964.*

La infección por *B. ovis* produce un impacto negativo en todos aquellos países donde la cría del ovino es una actividad económica importante. Esto se debe a una caída en la fertilidad de la majada, un aumento en el descarte de carneros infectados, acortamiento de la vida reproductiva de los machos, abortos, aumento de la mortalidad perinatal, complicaciones en el manejo y restricciones en el comercio. *Haughey, K. G. 1968. Moro, M.S. 1974. Robles et al., 1990.*

El organismo causal, *Brucella ovis*, fue aislado por primera vez en Nueva Zelanda por McFarlane y col. en 1952 a partir de ovejas abortadas. En 1953 la epididimitis en carneros es reportada simultáneamente por Simmons y Hall en Australia y por Buddle y Boyes en Nueva Zelanda. En 1956 es reportada por primera vez en América, *Kennedy, p.c.; 1950*, y en 1961 en Argentina, Szyfres y Chappel aíslan *B. ovis* del semen de unos carneros con epididimitis.

B. ovis es el agente etiológico de la epididimitis contagiosa de los carneros, enfermedad infectocontagiosa de distribución mundial que provoca un impacto negativo en aquellos países donde la cría de ovinos es una actividad económica importante. En estos países, la explotación ovina se ve afectada por bajos índices reproductivos, alto número de carneros descartados anualmente, acortamiento de la vida reproductiva de los machos, abortos, elevada mortalidad perinatal y la consecuente disminución en los rendimientos de carne y lana por hectárea (Robles y col., 1990). En México y Sudamérica, la epididimitis contagiosa constituye un problema muy importante en Argentina, Uruguay, Chile, Perú y sur de Brasil, aunque no existen estudios de prevalencia

a nivel nacional y no hay información disponible respecto de las pérdidas económicas que esta enfermedad ocasiona. *Robles et al., 1990.*

La infección por *B. ovis* se asienta básicamente en el aparato genital ocasionando en los carneros epididimitis y disminución de la calidad del semen, y en las hembras preñadas aborto y mortalidad perinatal *Alton et al., 1988.* En el macho, la brucelosis ovina por *B. ovis* causa una inflamación intersticial crónica con formación de un granuloma espermático en epidídimo, vesícula seminal y/o ampolla lateral *Paolicchi et al., 1992.* En esta última, el infiltrado periluminal sugiere una respuesta a antígenos intraluminales, ya sea *B. ovis*, fluido seminal o espermatozoides *Foster y col., 1987.* En caso que las lesiones se asienten en testículo ocasiona la formación de espermatocitos y esterilidad. Como consecuencia de estos trastornos, el semen disminuye su calidad debido a la presencia de células inflamatorias, detritos celulares, disminución del número y motilidad de los espermatozoides y anomalías morfológicas *Kott et al., 1988; Blasco. 1990.*

El desarrollo de la infección difiere sustancialmente en la oveja respecto del macho. En la hembra vacía, *B. ovis* produce vaginocervicitis y endometritis con la consecuente infertilidad temporaria *Homse y col., 1995.* En la hembra gestante, *B. ovis* hace bacteriemia y reaparece en el tracto genital a partir de la segunda mitad de la gestación ocasionando placentitis y muerte fetal *Bosseray, 1987* o el nacimiento de corderos con bajo peso y afectados de una neumonía supurativa o con lesiones en riñón o hígado que impiden su supervivencia *Libal, 1990.*

Si bien se cuenta con muchos métodos de diagnóstico y vacunas para la prevención y control es el tipo de explotación y la diversidad de hospedadores lo que hace que sea una de las principales zoonosis ya que como se sabe es la escasez de pastos lo que obliga a los ganaderos recurrir en la trashumancia haciendo difícil el monitoreo y vigilancia de los caprinos a la vez que es una gran manera de difusión de la enfermedad.

Por otra parte, la brucelosis al no presentar un cuadro clínico característico que permita una detección precoz del infectado permite que la infección se vuelva crónica, complicando las alternativas terapéuticas y la curación definitiva.

En el presente trabajo se da a conocer los principales aspectos de la infección con el género *Brucella* ovis específicamente la que tiene por hospedero al ganado ovino, así como sus implicaciones. Esta revisión recoge las experiencias y los métodos de diagnóstico y de tratamiento actualmente empleado en la lucha contra esta enfermedad.

ANTECEDENTES.

La brucelosis ha sido una enfermedad emergente desde el descubrimiento de la *Brucella* mellitensis por Sir David Bruce en 1887. Aunque muchos países han erradicado la *B. abortus* en el ganado, en algunas zonas *B. mellitensis* y *B. ovis* han surgido como causas de esta infección en el ganado, dando lugar a infecciones humanas. *B. mellitensis* en la actualidad sigue siendo la principal causa de brucelosis humana en todo el mundo. *Acha, P et al., 1986. Mantur B G and Amarnath S K 2008 Brucellosis in India a review; J. Biosci. 33 539–547.*

La brucelosis así denominada en honor de su descubridor David Bruce, este descubrió el origen bacteriano de la fiebre de Malta (posteriormente denominada fiebre Mediterránea o fiebre ondulante) en 1887 al estudiar el bazo de soldados británicos muertos como consecuencia de la enfermedad adquirida durante su estancia en la isla de Malta. Los estudios microscópicos de los cortes de bazo de estos pacientes mostraron unas bacterias de pequeño tamaño que se teñían con azul de metileno y con el método de coloración de Gram aparecían como Gram-negativas. Además, consiguió su aislamiento después de inocular muestras de bazo procedente de estos pacientes en un agar enriquecido. Al cabo de 68 horas de incubación a 37° C aparecieron unas colonias pequeñas y redondeadas formadas por bacterias que morfológicas y tintorialmente eran idénticas a las observadas previamente en los cortes de bazo de los pacientes fallecidos por fiebre de Malta. La inoculación de las bacterias a un mono le produjo la muerte, aislándose la misma bacteria en el hígado y en el bazo del animal. Esta bacteria fue inicialmente denominada *Micrococcus mellitensis*. (*Naparstek et al., 1982; Lubani et al 1988; Mantur et al., 1996; Tikare et al., 2008*).

Por otra parte, aunque el aborto epidémico del ganado vacuno era conocido con anterioridad en el estado de Louisiana en Estados Unidos, la bacteria causante, *Brucella abortus*, no fue aislada hasta 1895 cuando el veterinario Bernhard Bang en Copenhague la obtuvo a partir de productos de abortos de ganado vacuno.

Fue Alice Evans en 1918 quien estableció la relación de *Brucella abortus* con *Brucella mellitensis*, y en 1920 Karl F. Meyer sugirió incluir a estas bacterias dentro del nombre genérico de *Brucella*. Más confusa fue la identificación de *Brucella suis*, causante del aborto enzoótico en el ganado porcino, ya que inicialmente su descubridor Jacob Traum la identificó en 1914 como *Brucella abortus*.

El diagnóstico serológico de la brucelosis comenzó en 1897 cuando Almroth Wright y colaboradores describieron una técnica de seroaglutinación en tubos capilares útil para el diagnóstico. Esta técnica constituye el antecedente del método actual de seroaglutinación en tubo denominado seroaglutinación de Wright en honor de su descubridor.

MORFOLOGÍA.

B. ovis es un cocobacilo acapsulado que carece de flagelos y pili (Merchant y Packer, 1975). Es un microorganismo Gram negativo y que se tiñe de rojo con la coloración de Stamp (Ziehl Neelsen modificada) (Timoney y col., 1988) o de Macchiavello.

B. ovis crece en medios sólidos ordinarios como el agar tripticasa soya o agar Columbia, enriquecidos con suero normal equino, bovino u ovino en una concentración final del 5 al 10% (Alton y col., 1988) y en una atmósfera con 5-10 % de CO₂ (Corbel y Bringley-Morgan, 1984). Para un primer aislamiento a partir de semen, mucus cervical o muestras de necropsia se utilizan los medios de cultivo sólidos selectivos como el Thayer Martin modificado (Marín y col., 1996) o el agar Skirrow que permiten el crecimiento de *B. ovis* inhibiendo la presencia de otros microorganismos presentes en la flora normal de vagina o prepucio (Paolicchi y col., 1991; Terzolo y col., 1991).

Las colonias en medio sólido, visibles luego de un período de incubación de 3 a 5 días, son pequeñas, circulares, de borde entero, opacas, de superficie granular y con distintas tonalidades desde el blanco mate al marrón. Se caracterizan por formar agregados granulares al ser resuspendidas en solución fisiológica o en soluciones ácidas débiles. La morfología rugosa de *B. ovis*, puede ser observada en forma directa a través del método de transiluminación oblicua donde las colonias aparecen de color amarillo, con un aspecto seco, granular y opaco. La confirmación de la observación directa se realiza mediante el uso de acriflavina, colorante que auto aglutina las colonias rugosas, o por la tinción de las colonias de color rojo o púrpura con el cristal violeta (Alton y col., 1988).

Las colonias de *B. ovis* aglutinan en presencia de suero policlonal de conejo anti-R; no lo hacen con los sueros anti-M o anti-A, dirigidos contra los antígenos de Brucella en fase lisa. Recientemente, se ha desarrollado una prueba de coagulación con látex para identificación rápida de colonias rugosas de Brucella la cual podría tener resultados más netos y reproducibles que la prueba anterior (Bowden y col., 1997).

ESTRUCTURA ANTIGÉNICA

Los antígenos de *B. ovis* han sido estudiados por su interés tanto para el diagnóstico como para la inmuno profilaxis. En cortes estudiados por microscopía electrónica, las especies del género Brucella presentan una envoltura celular trilaminar constituida por una membrana interna o citoplasmática, separada de la membrana externa (ME) por un espacio periplásmico rico en proteínas solubles y peptidoglicano (PG) *Dubray y Plommet, 1976.*

En la ME se encuentran dos grupos de antígenos mayores: el lipopolisacárido rugoso (LPS-R) y las proteínas de membrana externa (PME). Ambos se encuentran expuestos en la superficie de la ME presentando epitopes accesibles a los anticuerpos monoclonales (Acm) ya que no existe el impedimento estérico de la cadena O del lipopolisacárido presente en las cepas lisas de Brucella. Esto ha sido comprobado mediante distintas técnicas tales

como ELISA sobre células enteras, microscopía electrónica y citometría de flujo Bowden et al., 1995a.

El LPS-R es una molécula compleja y de bajo peso molecular compuesta por el lípido A y un núcleo o "core" constituido por oligosacáridos de glucosa, manosa y el 2-ceto, 3-desoxioctonato (KDO). Este último se encuentra en mayor proporción en *B. ovis* con respecto del resto de las especies de *Brucella* (Afzal y col., 1984a). Aunque en el lípido A y en el "core" existen epitopes compartidos con cepas rugosas de otras brucelas, hay también epitopes específicos de *B. ovis* (Díaz y Bosseray, 1973; Moreno y col., 1984; Suárez y col., 1990) y otros comunes con especies de otros géneros pertenecientes a la subdivisión a-2 de la clase Proteo bacteria (Moreno y col., 1990; Velasco y col., 1997).

La ME de *B. ovis* contiene dos grupos de PME que se clasifican en mayores y menores de acuerdo a su abundancia relativa, las cuales se hallan estrechamente unidas al LPS-R. Al primer grupo pertenecen las proteínas de 36-38 kDa (Omp2b) o llamadas grupo 2 que funcionalmente son porinas (Verstreatte y col., 1982) y el grupo 3 compuesto de las proteínas de 25-27 kDa y 31-34 kDa, actualmente denominadas Omp25 y Omp31 respectivamente, las cuales se encuentran asociadas fuertemente al PG (Cloeckaert y col., 1992).

Los genes que codifican para las PME mayores se encuentran conservados en las distintas especies de *Brucella*. En el caso del gen para la Omp 25 presenta en *B. ovis* una única delección que permite distinguirla de las otras especies del género. En *B. ovis*, esta proteína presenta un peso molecular menor y una conformación diferente, la cual permitiría la exposición de epitopes discontinuos específicos en superficie (Cloeckaert y col., 1996a). Por otro lado, el clonado y la secuenciación del omp25 reveló que esta proteína no pertenece a la familia OmpA presente en otras Gram negativas como se había sugerido anteriormente de acuerdo a la composición aminoacídica (Cloeckaert y col., 1996b).

La proporción de las PME varía en las distintas especies, en el caso de *B. ovis*, las PME del grupo 3 son predominantes (Santos y col., 1984) y abundan en las vesículas liberadas espontáneamente durante la fase de crecimiento exponencial (Gamazo y col., 1989).

Las PME menores son las proteínas de 10 kDa, 16,5 kDa, 19 kDa y 89 kDa (89-94 kDa o grupo 1) habiéndose encontrados marcadores específicos de *B. ovis* en las primeras tres proteínas, actualmente llamadas Omp10, Omp16, Omp19 respectivamente. Estudios realizados con las Omp10 y Omp19 mostraron que esta última proteína presenta en *B. ovis* una masa molecular aparente mayor que en el resto de las especies aunque queda por investigar si esta diferencia tiene origen genético (Tibor y col., 1996). También se encuentra presente en la ME, una lipoproteína de 8 kDa que posee determinantes antigénicos comunes con la lipoproteína Braun de *E. coli*, la que se encuentra unida en forma covalente al PG (Gómez-Miguel y col., 1986 y 1987).

Recientemente, se ha identificado en el espacio periplásmico, una proteína de 26 kDa (BP26) que ha sido caracterizada y clonada y que se presenta altamente conservada en el género *Brucella*. Por otro lado, en el citoplasma, se ha identificado y caracterizado una proteína de 18 kDa, específica del género *Brucella*, cuyo gen ha sido clonado (Goldbaum y col., 1993) y secuenciado (Hemmen y col., 1995).

RESPUESTA INMUNITARIA HUMORAL Y CELULAR

La respuesta inmunitaria humoral a *B. ovis* ha sido estudiada a través de las pruebas serológicas clásicas. Sin embargo, sólo a través del western blot se han podido identificar los antígenos individuales y su inmuno dominancia en el curso de la respuesta humoral a *B. ovis*. Los estudios realizados en ovinos infectados natural y experimentalmente, indican que la respuesta inmunitaria humoral ha estado dirigida principalmente contra el LPS-R y las PME del grupo 3, ambos expuestos en la superficie de *Brucella* y presentes en el extracto salino obtenido por calentamiento (HS) Riezu Boj et al., 1986 y 1990. En animales con epidídimo-orquitis la respuesta fue más intensa y dirigida hacia un mayor número de proteínas que en aquellos sin síntomas debidos, probablemente, a una mayor estimulación antigénica. En otros estudios se identificaron cinco antígenos inmuno dominantes presentes en las fases aguda y crónica de la infección: el LPS-R, las PME de 17, 19 y 29 kDa (reconocidas por los Acm anti-Omp 16, anti-Omp 19 y anti-Omp 25, respectivamente) y una proteína del estrés térmico de 63 kDa Kittelberger et al., 1995a. Estudios

posteriores llevados a cabo por estos mismos autores confirman estos hallazgos Kittelberger et al., 1995b, 1996, 1997, 1998.. Recientemente, la investigación de un suero de carnero naturalmente infectado, fue estudiada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en dos dimensiones (2-D PAGE) y western blot (Teixeira-Gomes y col., 1997). Los resultados obtenidos indicaron que si bien hay anticuerpos dirigidos hacia las PME (PME de 89 kDa), también se reconocen proteínas periplásmicas (BP26) y citoplasmáticas (DnaK, GroEL).

Entre los animales de laboratorio, el ratón ha sido elegido para estudiar la respuesta inmunitaria a *B. ovis* (Jiménez de Bagués y col., 1993). Una de las estrategias utilizadas para identificar antígenos protectores se ha basado en la inyección de Acm anti-PMEs y anti-LPS-R previa a la inoculación de *B. ovis*. Los resultados de estos ensayos de protección indicaron que las PME menores y Omp31, son blancos importantes de la inmunidad humoral con una importante participación del LPS-R en la protección Bowden y col., 1995b; Estein y col., 1996. Si bien se desconocen cuáles son los mecanismos de protección participantes, algunos autores se refieren a la opsonización como facilitadora de la muerte intracelular de *B. ovis*, lo que sugiere un probable rol de los anticuerpos, en tanto que la muerte extracelular podría estar mediada por el complemento o por las células "natural killer" Jiménez de Bagués et al., 1994a.

B. ovis es un parásito intracelular facultativo, capaz de sobrevivir y multiplicarse en el interior de los macrófagos al abrigo de la acción de los anticuerpos y defensas innatas del huésped. Si bien la inmunidad celular no ha sido aún estudiada en el carnero, ensayos en el ratón permitieron establecer que la transferencia pasiva de suero anti-HS resultó en una mayor protección que la transferencia de células sensibilizadas a dicho antígeno (Jiménez de Bagués y col., 1994b). Por otro lado, el suero anti-B. abortus RB51 (cepa vacunal rugosa) confirió mayor protección que las células inmunes en el control de la infección por *B. ovis* Jiménez de Bagués y col., 1994b. Por lo anteriormente expuesto, la inmunidad humoral cumpliría un rol más importante que la celular en la protección, aunque se desconoce cuáles son las células implicadas en la respuesta. Por otro lado, el predominio de los isotipos IgG2a e IgG3 en ratón permitiría inferir que *B. ovis* induce la población de linfocitos T

colaboradores del tipo 1 (LTh1) productores de interferón γ *Jiménez de Bagués y col., 1994a.*

Durward M, Harms J, Magnani D, Eskra L, Splitter GA. Del Departamento de Patología y Laboratorio de Medicina de la Facultad de Medicina y Salud Pública, Universidad de Wisconsin-Madison, Madison, WI 53706, Departamento de Ciencias patobiológicas, Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Wisconsin-Madison. En el 2009, en su artículo dan a conocer *Discordant Brucella mellitensis Antigen Yield Cognate CD8+ T cells in vivo.* (Antígenos discordantes de *Brucella mellitensis* Rendimiento Cognado células T CD8 + en vivo). Comunican lo siguiente que *Brucella* spp. son bacterias intracelulares que causan la zoonosis más frecuente en el mundo. Aunque el trabajo de los últimos ha avanzado el campo de desarrollo de la vacuna *Brucella*, no queda ninguna vacuna humana segura. Con el fin de producir una vacuna humana segura y eficaz, la respuesta inmune a la *Brucella* spp. requiere una mayor comprensión. La inducción de CD8 específicas de *Brucella* (+) Las células T se considera un aspecto importante de la respuesta del huésped, sin embargo, la CD8 (+) respuesta de células T no está claramente definido. Descubriendo el epítipo que contienen los antígenos reconocidos por *Brucella* CD8 específicas (+) las células T y la correlación con los datos de micro arrays será de ayuda en la determinación de las proteínas fundamentales para el desarrollo de vacunas que cubren un continuo cinética durante la infección. El desarrollo de instrumentos para tomar ventaja de la BALB / c modelo de ratón de la infección por *Brucella mellitensis* ayudará a clarificar los correlatos de inmunidad y mejorar la eficacia de este modelo. Dos H-2 (d) CD8 (+) epítopos de células T se han caracterizado, y un grupo de proteínas inmunogénicas han provocado la producción de IFN- γ por CD8 (+) las células T. RYCINSASL y NGSSSMATV inducida CD8 afines (+) las células T después de la inmunización péptido que mostró la muerte específica en vivo. Señalan con importancia haber encontrado por el análisis de micro matrices de que los genes que codifican estos epítopos son expresados diferencialmente después de la infección de los macrófagos, haciendo hincapié además en que

estos genes discordantes pueden desempeñar un papel importante en la patogénesis de la infección por *Brucella mellitensis*. Durward M, et al., 2009.

Infect Immun. 2009.

Da Costa Martins R, et al., del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y el Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Navarra, Pamplona, España. En su Artículo, Evaluación de partículas de vacunas acelulares contra la infección por *Brucella ovis* en carneros. Del 2009., comentan que, *Brucella mellitensis* vacuna Rev 1, atenuada utilizada contra la infección por brucelosis, interfiere con las pruebas de diagnóstico serológico, puede inducir abortos en hembras preñadas, y puede infectar a los humanos. Con el fin de superar estos inconvenientes, hemos desarrollado vacunas acelulares basado en un complejo de antígenos de *Brucella ovis* (SA), que contiene proteínas de membrana externa y LPS-R atrapados en poli (anhídrido) nanopartículas convencionales y mannosylated (NP-HS y Man-NP-HS) o en el poli (varepsilon-caprolactona) micropartículas (HS-PEC), como sistemas de suministro de antígenos e inmuno adyuvantes. Carneros indemnes de brucelosis fueron vacunados por vía subcutánea con una dosis única de partículas que contiene 3 mg de HS, y desafió a 6 meses después. La protección se evaluó mediante los exámenes clínicos, bacteriológicos y serológicos, en comparación con los no vacunados de control de los carneros. HS-PEC inducida por la vacuna de protección (7 de cada 13 animales fueron infectados) equivalente a la inducida por la vacuna de referencia Rev 1 (8 / 14). En contraste, los animales inmunizados con NP-HS no estaban protegidos, con resultados similares a los obtenidos en el control de los carneros no vacunados. Además HS-PEC vacuna no interfiere contra *B. mellitensis* pruebas de diagnóstico serológico. En resumen, HS-micropartículas de PEC podría utilizarse como una vacuna segura y eficaz contra la brucelosis en los carneros. Da Costa Martins R, et al., vacuna. 2009 Nov 1.

PATOGÉNESIS

B. ovis, al igual que las otras brucellas, entra al organismo a través de las membranas mucosas. Sin embargo no está completamente claro cual sería la principal ruta de entrada en condiciones naturales *Bulgin, M.S. 1990a*.

Una vez atravesada la mucosa y siguiendo el curso de los linfáticos aferentes, la bacteria llega a los ganglios linfáticos regionales. De allí y vía sanguínea la bacteria invade todo el organismo infectando el tracto genital, hígado, bazo, pulmones, riñón y otros ganglios linfáticos. Ya hacia el final del segundo mes post exposición, *B.ovis* desaparece de ganglios linfáticos y otros órganos encontrándose únicamente en epidídimos, vesículas seminales, glándulas bulbo uretrales, ampollas de los conductos deferentes y a veces en riñón.

Bulgin, M.S. 1990a. Blasco, J.M. 1990. Revista de Medicina Veterinaria Vol. 79 N°1.-1998.

Establecida en los epidídimos, *B.ovis* produce una reacción inflamatoria caracterizada por edema peri vascular e infiltración celular del tejido conectivo. Se produce hiperplasia del epitelio de los túbulos epididimarios y un proceso de metaplasia conduce a la formación de vesículas intraepiteliales. Los cambios epiteliales conducen a la extravasación de espermatozoides al intersticio causando una fuerte reacción inflamatoria y la formación de granulomas espermáticos. *Biberstein, E.L.; 1964, Blasco, J.M. (1990).*

Las vesículas seminales y las ampollas parecen ser el asiento más común de la infección por *B.ovis*. *Biberstein, E.L.; 1964, Foster, R. A.; 1987*. Esto explicaría la presencia de carneros positivos a la serología de *B.ovis*, pero sin lesiones palpables en el aparato reproductor. *Bulgin, M.S. 1990a*.

B.ovis ha sido aislada en carneros a partir de epidídimo, testículo, túnica vaginal, vesículas seminales, ampollas de los conductos deferentes, glándulas bulbo-uretrales, hígado, riñón, bazo y ganglios linfáticos regionales. *Searson, J.E.1986, Blasco, J. M.; 1987*, sin embargo el semen es la vía más importante de excreción y transmisión de la enfermedad. *Haughey, K. G.; 1968*.

ASPECTOS CLÍNICOS

Si bien los síntomas clínicos iniciales pasan generalmente desapercibidos, los animales tienen un período de fiebre acompañada de desgano, respiración agitada e inflamación del escroto y su contenido. *Buddle, M. B. 1956b.*

La primera lesión palpable en los epidídimos aparece a los 45 días, tras la inoculación de *B.ovis* vía conjuntival, *Biberstein, E.L.; 1964.* Sin embargo, *Bulgin 1990b* describe que las lesiones aparecen ya a partir de las dos semanas post-inoculación y que el lugar más frecuentemente afectado es la cola del epidídimo. *Simons y Hall 1953.* Describen que la inflamación de los testículos, el dolor local y la acumulación de líquido dentro de la bolsa escrotal, son también signos clínicos tempranos de la infección.

Pasado el período agudo, las lesiones palpables varían de un leve aumento del tamaño a severas induraciones del o los epidídimos con testículos blandos y atrofiados y adherencias entre las capas vaginal y parietal de la túnica vaginal *Watt, D.A. 1972. Jansen, B.C. 1980a.*

Los carneros afectados mantienen una libido normal, *Watt, D.A. 1972.* La calidad del semen es variable pero usualmente la concentración y la motilidad de los espermatozoides está disminuida, aparecen defectos de la cola y cabezas sueltas y hay una cantidad variable de neutrófilos *Buddle, M. B. 1956b, Cameron, R. D. y Lauerman, L H. 1976.*



FOTO 1

PATOLOGÍA

Patología macroscópica

Los cambios patológicos en carneros están prácticamente restringidos al tracto genital, involucrando principalmente los epidídimos, los testículos y las glándulas sexuales accesorias *Buddle, M. B. 1956b*. La respuesta del animal es variada y puede estar dirigida contra antígenos de los espermatozoides, fluido seminal, la *Brucella* misma o una combinación de estos. *Foster, R. A. 1987*.

Las primeras lesiones aparecen en la cola del epidídimo. Los hallazgos macroscópicos en una etapa ya crónica de la enfermedad consisten en aumento del tamaño del epidídimo afectado, hasta 4 o 5 veces su tamaño normal. *Simmons, G. C. y Hall, W.T. 1953. Plant, J. W.; 1986*. La cola del epidídimo afectada está firme al tacto con un contorno irregular. Al cortar el órgano aparecen abscesos con un contenido cremoso o caseoso y es comprobable un aumento del tejido conectivo intersticial en donde pueden advertirse adherencias entre el epidídimo con el testículo y la túnica vaginal *Simmons, G. C. y Hall, W.T. 1953*.

En algunas ocasiones el epidídimo entero está totalmente afectado, pero es de hacer notar que la afección de la cabeza y cuerpo del epidídimo, está siempre precedida por la afectación de la cola del mismo órgano. Los cambios en los testículos son siempre secundarios a aquellos de los epidídimos. La atrofia testicular es el hallazgo más común y es más severo en aquellos casos donde hubo gran cantidad de adherencias. La presencia de calcificaciones también han sido reportadas. *Plant, J. W.; 1986*.

Patología microscópica

Las lesiones microscópicas en los epidídimos consisten en edema intersticial con infiltración perivascular de linfocitos y células plasmáticas. También es característico de la infección por *B.ovis* la metaplasia y la hiperplasia focal del epitelio epididimal con la formación de vesículas intraepiteliales con acumulación de neutrófilos dentro de las mismas *Marin, c.m.; Barberan, m.; Jimenez de Bagues, J.; Blasco, j.m. 1990*. Estos cambios son generalmente segmentales y más severos en la parte distal del epidídimo.

Como resultado del edema intersticial y cambios en el epitelio se produce un angostamiento y obliteración de la luz del túbulo epididimal con éstasis espermático. Los granulomas espermáticos están conformados por un núcleo de espermatozoides extravasados rodeados por células epitelioides, células gigantes y linfocitos. Comúnmente se desarrolla alrededor del granuloma un proceso activo de fibrosis. *Kennedy, P.C.; 1956.*

Las lesiones microscópicas en las vesículas seminales y ampollas de los conductos deferentes consisten en infiltración de macrófagos, linfocitos, células plasmáticas y neutrófilos dentro del estroma y epitelio *Searson, J.E.1987,* y procesos de fibrosis e hiperplasia epitelial con vesículas intra epiteliales, similares a lo observado en epidídimo *Blasco, J. M.;1987.*

EPIDEMIOLOGÍA.

Distribución.

La presencia de *B.ovis* es universal y su distribución varía de acuerdo a diferentes factores cuales son la región, la raza, la edad, el sexo, etc. La infección por *B.ovis* ha sido registrada en la mayoría de aquellos países en donde la cría de ovinos es una actividad económica importante, Si bien hay algunos países que han controlado y erradicado la enfermedad, de muchos otros no hay información disponible *FAO 1992.* *B. ovis* infecta en forma natural exclusivamente a la especie ovina, siendo el macho más susceptible a la infección que la hembra. Por otro lado, la raza Merino es más resistente a la infección que las razas británicas y sus cruza, en condiciones de explotación similares. Aunque la resistencia genética sería importante, las diferencias de precocidad y actividad sexual entre estas razas podría ser el aspecto determinante de la diferencia en la susceptibilidad *Timoney y col., 1988.*

No se han encontrado diferencias en la incidencia de epididimitis entre varias razas como la Suffolk, Hampshire, Merino, Karakul, Persas y Doper. Sin embargo *Hajdu 1962.* reporta que la incidencia de *B.ovis* fue más alta en las razas Tsigai y Valachian que en Merino. *Blasco y Barberán 1990.* También observaron una menor incidencia en Merino y razas derivadas del Merino, que en otras razas europeas como la Suffolk, Ile de France y Romanov. Estas

diferencias de opinión marcan la necesidad de investigar el tema y realizar comparaciones de diferentes razas en la misma región y bajo manejo similar ya que si se pudiera demostrar que realmente existe algún factor de resistencia en alguna de las razas, sería un hallazgo de real importancia en el futuro control de la enfermedad.

La enfermedad ha sido reproducida en animales de solo 4 meses de edad *Burgess, g. w.; Mcdonald, j. w.; Norris, m. j. 1982.*

Sin embargo en carneros naturalmente infectados el cuadro es diferente ya que *B.ovis* se aísla comúnmente de carneros adultos con experiencia sexual previa y muy raramente en animales jóvenes. *Blasco y Barberán 1990.* Después de analizar los datos de 2500 carneros concluyeron que el porcentaje de carneros infectados con *B.ovis* aumenta a medida que aumenta la edad. Sin embargo, en un estudio conducido recientemente donde se controlaron los 600 carneros de un establecimiento durante 3 años y anualmente se descartaron todos los animales con lesiones crónicas, pudo establecerse, que la incidencia de la enfermedad aumentaba hasta los carneros de 3 años y luego decaía. Esto sugiere que la prevalencia de la enfermedad está mas en relación con la actividad sexual que con la edad *Robles, C. A. 1994.*

La infección experimental de caprinos jóvenes y adultos demostró que estos son menos susceptibles que los carneros ya que la infección en esta especie es de carácter leve y de corta duración (*García Carrillo y col., 1974*). Por otro lado se desconoce si la infección se transmite del ovino al caprino en condiciones de campo. En el hombre se han hallado reacciones serológicas positivas (*Meyer, 1982*), pero no se ha citado la infección en esta especie.

B. ovis afecta principalmente el tracto reproductor del carnero y produce infertilidad ya que altera la calidad del semen (*Kott y col., 1988; Bulgin y col., 1990a*). Si bien la transmisión venérea es la principal vía de contagio, en machos con experiencia sexual (*Buddle y col., 1983; Radostits y col., 1994*), el contagio de carneros vírgenes se produce frecuentemente en períodos de estabulación prolongada por el contacto con orina de animales infectados. En estas condiciones el germen ingresa al organismo a través de las mucosas nasal (olfateo), oral (lamido), conjuntival o por la vía percutánea a través de heridas o escoriaciones (*Alton y col., 1988; Bulgin y col., 1990c*). Asimismo, la

conducta homosexual de los machos fuera de la época de servicio, favorecería la entrada del microorganismo a través de la mucosa rectal (sodomía) (*Bulgin y Anderson, 1983; Bulgin, 1990d*).

El carnero infectado con *B. ovis* constituye el principal reservorio en el rebaño, siendo el semen fundamental en la difusión del germen. La liberación de *B. ovis* en semen es intermitente y por períodos prolongados, habiéndose hallado cultivos positivos hasta 80 semanas post-infección experimental (*Paolicchi y col., 1991; Radostits y col., 1994*).

Aunque la oveja es relativamente resistente a la infección algunos autores sostienen que juega un rol importante en la difusión de la enfermedad (*Homse y col., 1995*). La hembra infectada transmite el germen a otros machos sanos si es montada por éstos dentro de un mismo ciclo estral y esto explica los brotes de brucelosis posteriores a la época del servicio. Raramente la hembra mantiene la infección por más de dos ciclos y siendo responsable de difundir la enfermedad de un año a otro (*Bulgin y col., 1990b*). Si bien *B. ovis* no afecta la concepción, puede provocar mortalidad embrionaria con infertilidad transitoria y en menor proporción abortos hacia el final la gestación (*Homse y col., 1995*) así como placentitis, la cual impide la nutrición fetal y ocasiona abortos o el nacimiento de corderos prematuros o débiles (Libal, 1990). Si no se presta adecuada asistencia en el momento del parto, el cordero infectado muere; si sobrevive éste puede ser un potencial portador pudiendo desarrollar la enfermedad al llegar a la pubertad. Aunque la oveja se recupera de la infección luego del parto, se ha comprobado que ésta excreta *B. ovis* a través de las secreciones vaginales y uterinas, placenta y loquios. Asimismo, si bien la leche es una potencial fuente de infección, no existe información de la transmisión por esta vía al cordero lactante.

Transmisión natural

La infección natural por *B. ovis* ocurre solamente en el ovino y no constituye una zoonosis. La difusión de la enfermedad entre carneros infectados y no infectados, como resultado del contacto directo entre animales fue demostrado por *Buddle en 1955*. También fue demostrada la transmisión

de carneros infectados a ovejas preñadas y de un carnero sano luego de mantener un contacto sexual con una oveja sana que había sido montada previamente por un carnero infectado.

No ha sido posible demostrar hasta el momento la transmisión de la enfermedad de la madre al cordero, de ovejas infectadas a ovejas sanas y por ovejas infectadas, de una estación reproductiva a la próxima *Hartley, W. J. et al., 1955. Buddle 1955*, no pudieron demostrar infección en carneros y ovejas preñadas que estuvieron pastoreando en pasturas contaminadas.

La mayor tasa de contagio ocurriría básicamente por la vía venérea pasiva durante el servicio, y la actividad homosexual de los carneros fuera de la época de servicio sería la segunda forma mas importante de transmisión de la enfermedad *Buddle, M. B. 1955 Hartley, W. J. et al., 1955*.

Infección artificial de ovinos con B.ovis.

Experimentalmente, *B. ovis* ha sido transmitida por inoculación endovenosa; inoculación intra-testicular e intraepididimal y subcutáneamente. La instilación de semen infectado y/o cultivos de la bacteria también han sido usados para reproducir la enfermedad. Esto incluye la mucosa bucal; la conjuntiva; la mucosa nasal; mucosa prepucial, Proceso uretral y pene Laws, L. et al., 1972. y la mucosa rectal . *Jebson, j. I.; Hartley, w. j.; Mcfarlane, d. 1954. Hartley, W. J. et al., 1955*.

Según *Marin et al., 1990*. Los mejores resultados en estudios de reproducción experimental de la infección se obtienen usando la vía conjuntival y prepucial simultáneamente. Usando dosis de 10^8 y 10^9 macroorganismos los autores lograron el 100% de infectividad en carneros.

Transmisión a otras especies.

Se ha logrado transmitir experimentalmente la infección a bovinos, a caprinos *Burgess, G. W. et al., 1985*, a cobayos, a conejos y a ratones y a ratas pero no se han reportado casos de infección natural en estas especies. *Simmons, G. C, 1985*.

DIAGNOSTICO

Al presente, el diagnóstico de infección por *B. ovis* en carneros se basa en la revisión clínica del aparato reproductor del carnero, detección de anticuerpos específicos contra *B. ovis* o el aislamiento de la bacteria de semen o tejidos. Sin embargo hay una diversidad de opiniones entre diferentes autores respecto a la performance de estas técnicas.

D. clínico.

La palpación de los órganos genitales externos, permite el diagnóstico de la epididimitis, que es una de las manifestaciones clínicas frecuentes de la infección. Si bien la técnica es barata y fácil de llevar a cabo, los resultados no son concluyentes, porque:

(a) hay otros organismos como *Actino Bacillus seminis*, *Histophilus ovis*, *Corynebacterium spp*, *Escherichia coli*, *Pasteurella spp*, etc., que producen epididimitis palpables.

(b) no todos los carneros infectados desarrollan epididimitis.

(c) algunos carneros infectados con lesiones palpables a la revisión clínica, pueden estar clínicamente normales al practicarse una nueva revisión clínica unas semanas más tarde. Sin embargo se debiera recomendar siempre a los productores adoptar esta técnica ya que no solo permite detectar a los animales que presentan epididimitis por causas infecciosas sino lesiones de tipo congénito o adquirido en el tracto genital.

Van Tonder, E. M. 1977. Robles, C.A.; Urcullu, J.A.; Uzal, F.A. 1990.

DetECCIÓN DEL AGENTE

Tinciones.

Improntas de semen o tejidos pueden ser teñidas con Gram, pero la técnica más específica es la coloración de Ziehl-Neelsen modificada en la cual *B. ovis* aparece como un pequeño cocobacilo teñido de rojo. Si bien la técnica es sencilla, la presencia de otros microorganismos como *Coxiella* y *Chlamydia* que son patógenos también del tracto genital, pueden llevar a confusiones y además hay que recordar que *B. ovis* es excretada en forma intermitente por el

semen. La coloración de Giemsa puede ser usada para detectar la presencia de células inflamatorias en el semen, lo que provee la indicación más temprana de infección en el tracto genital pero es incapaz de determinar el agente causal.

Estos dos tests pueden ser combinados en uno solo, ya que si se usa la coloración de Stamp, ésta detectará los microorganismos presentes y también teñirá los neutrófilos. Por su simplicidad, es una técnica que debiera usarse de rutina en la evaluación del semen de carneros donantes en programas de Inseminación Artificial. *Alton, G.G.; 1988.*

Cultivo.

El aislamiento de *B.ovis*, para fines diagnósticos en carneros sospechosos se puede intentar de muestras de semen. Sin embargo un resultado negativo no nos asegura que el animal no esté infectado ya que *B.ovis* se excreta por semen en forma intermitente. Para el cultivo de muestras de campo el medio selectivo de Thayer-Martin y el medio de Skirrow modificado son los más recomendados para el aislamiento de *B.ovis*. *Terzolo, H.R. et al., 1991 Webb, R.F.; (1980).*

El diagnóstico bacteriológico no es un método apropiado para estudios de prevalencia ni para la detección de animales infectados en un programa de control o relevamiento. Sin embargo el aislamiento del agente causal sigue siendo la única forma de arribar a un diagnóstico definitivo y es el estándar de oro para la evaluación de la mayoría de los test diagnósticos.

Técnicas inmunológicas.

La inmunofluorescencia directa en improntas y la peroxidasa anti-peroxidasa en cortes histológicos parafinados han sido desarrolladas para *B.ovis*, pero hasta el presente no han sido usadas de rutina en diagnóstico. *Foster, R.A.; 1988.*

La técnica de Peroxidasa anti-peroxidasa podría ser una buena alternativa a la bacteriología en tareas de diagnóstico ya que permite identificar y ubicar la bacteria y ver la estructura del tejido a la vez, lo que es de suma utilidad en estudios de patogénesis. Sin embargo se necesita más investigación para mejorar fundamentalmente su sensibilidad.

Sondas moleculares de DNA.

Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).

Hopper et al., 1989 desarrollaron un test de hibridación usando una sonda biotinilada a partir del DNA de *Brucella abortus* cepa 19, pudiendo detectar directamente *B. abortus* en tejidos fetales de un ternero abortado. En 1990, *Fekete et al.*, desarrollaron una PCR usando una secuencia de 635pb de *Brucella abortus* cepa 19. El método fue altamente sensible ya que fue capaz de detectar 25 cepas diferentes de *B. mellitensis*, *B. abortus*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. suis* y *B. neotomae* y altamente específico ya que los resultados fueron siempre negativos ante una variedad de bacterias, virus y hongos. Recientemente *Romero et al., 1995*, hallaron resultados similares con una PCR, que detectó las 6 especies de brucellas y todas sus bio variedades.

El test tiene una alta sensibilidad y especificidad, sin embargo al ser incapaz de distinguir las diferentes especies de *Brucella*, en las regiones donde existe la infección mixta en ovinos por *B. mellitensis* y *B. ovis*, se pueden crear situaciones confusas.

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS SÉRICOS.

En contraste con *Brucella abortus*, *Brucella mellitensis* y *Brucella suis* que son *Brucellas* lisas, *B. ovis* es del tipo rugoso. Esta característica es importante para el tipo de test que se va usar, ya que *B. ovis* no tiene la habilidad de formar suspensiones estables y por lo tanto los test basados en

aglutinaciones no son de utilidad *Moriyon, I. y Gamazo, C. 1990 Alton, G.G.1988.*

Para la realización de todos los tests serológicos el extracto salino en caliente que contiene proteína y también lipopolisacárido rugoso es el antígeno más recomendado *Alton, G.G.; 1988.*

Prueba de la Fijación del complemento (FC).

La FC es la prueba más utilizada para el diagnóstico serológico de la infección por *B. ovis*. Ha sido usada con éxito junto con otros procedimientos en programas de control para eliminar la brucelosis ovina a nivel de establecimiento, sin embargo es sabido que da tanto falsos positivos como falsos negativos, es complicada y tediosa de realizar, no puede ser usada con sueros anticomplementarios o muy bemozados, suelen ocurrir fenómenos de prozona, son necesarias 8 diluciones de cada suero, hay que inactivar los sueros y los reactivos utilizados son inestables y hay que estandarizarlos prácticamente todos los días *Blasco, J.M. 1990. NIILO, L. 1984.*

Doble inmunodifusión en gel de agar (DDG).

Desde que fuera reportada por Myers y Siniuk (1970) la doble difusión en gel ha sido ampliamente utilizada pero con diferentes procedimientos y por lo tanto con resultados variados, pero cuando la prueba es estandarizada con una concentración adecuada de cloruro de sodio en el gel y un antígeno apropiado, la doble difusión en gel es tan sensible y específica como la fijación del complemento *Marin, C. M.1989.*

Los geles pueden prepararse con diferentes agares, agarosas y bufferes pero los geles hipertónicos (10% de ClNa) son altamente recomendables *Diaz, R.1979.*

El antígeno obtenido a través de una extracción salina en caliente y a una concentración de entre 2-10 mg/ml es el que da los mejores resultados.

La DDG es barata, fácil de realizar e interpretar y no requiere ni equipos o instalaciones especiales. Las mayores desventajas son que el antígeno no ha

sido estandarizado, los resultados se leen recién a las 72 horas y el resultado es solo cualitativo, aunque esto último no necesariamente es un problema.

Basado en la DDG, Myers y Varela Díaz 1979, desarrollaron una prueba de contrainmunolectroforesis. Los resultados son comparables con los de la DDG y la FC con la ventaja de que los resultados se tienen en pocas horas. *Worthington, R.W. Weddell, W. Penrose, M.E. 1984.*

Enzimoinmunoensayo (ELISA).

Un test de ELISA para *B. ovis* fue descrito por primera vez por *Chin (1983)* y por *Rahaley y col. (1983)*. El uso del test de ELISA para el diagnóstico de infección por *B. ovis* viene incrementándose ya que no solo es el test mas sensible cuando se lo compara con la FC y la DDG sino que tiene una serie de ventajas cuales son:

(a) no es necesario inactivar los sueros como para la FC. *Marin, C. M. 1989. Worthington, R.W. 1984.*

(b) no tiene problemas con sueros hemolizados o anticomplementarios.

(c) trabaja con una sola dilución del suero.

(d) requiere una mínima cantidad de antígeno.

(e) los reactivos son en general más estables que aquellos que utiliza la FC. Finalmente, el test de ELISA es capaz de detectar cualquier tipo de inmunoglobulina dependiendo del conjugado que se use y puede ser totalmente automatizado. *Marin, C. M. 1989. Worthington, R.W. 1984.*

Otros tests.

Una prueba de hemaglutinación indirecta y una prueba de (IFI) inmunofluorescencia indirecta para detectar anticuerpos en el suero contra *B. ovis* han sido reportadas, sin embargo es imposible obtener alguna conclusión sobre la utilidad de estos test ya que nunca han sido usados rutinariamente para diagnóstico. *Cox, j.c. 1977, Cox, j.c. 1963.*

CONTROL.

El control de la enfermedad se apoya en la eliminación de los machos con diagnóstico bacteriológico y/o serológico positivo, y en la vacunación en lugares con alta prevalencia. Blasco, 1990. Las técnicas más eficientes para el serodiagnóstico de la infección por *B. ovis*, son la fijación del complemento, la inmunodifusión doble bidimensional y ELISA que utilizan como antígeno el extracto salino obtenido por calentamiento (HS). Recientemente se ha desarrollado un ELISA indirecto utilizando una proteína periplásmica como antígeno con utilidad para el diagnóstico de la infección por *B. ovis* *Arese et al., 1997.*

Diagnóstico y sacrificio.

La infección por *B. ovis* puede ser erradicada por el sistema de diagnóstico y sacrificio de los positivos. Esta metodología es recomendable fundamentalmente cuando la prevalencia de la enfermedad es baja *Nicoletti, p. 1989.*

El éxito de cualquier programa de control y erradicación depende en gran parte de que se detecten todos los animales infectados en la majada ⁽¹⁰¹⁾. Sin embargo debido a que no existe ningún método hasta el momento que pueda detectar el 100% de los animales infectados, se recomienda usar una combinación de métodos *Rahaley, R.S. 1983. Worthington, R.W. 1984.*

La FC y la DDG y aún mejor el ELISA son los métodos serológicos más adecuados para la detección de carneros infectados en majadas bajo sistemas extensivos de cría, sin embargo los resultados de la serología deben ser siempre considerados junto con el historial de la majada y los resultados de la revisión clínica de los carneros ^(2, 58, 101). *West, D.M. 1991. Marin, C.M. et al., 1990.*

En el caso de majadas pequeñas o cabañas aparte de los estudios serológicos y clínicos se puede arribar a un diagnóstico más certero agregando

otros estudios como son tinciones y/o bacteriología del semen *Bulgin, M.S. 1990^a*.

Para lograr la erradicación de la enfermedad a nivel de una majada, todos los carneros deben ser examinados periódicamente para detectar a los infectados y cualquier carnero con lesiones epididimarias y/o anticuerpos contra *B. ovis*, debe ser eliminado del establecimiento. Se puede considerar que un establecimiento está libre de la enfermedad cuando todos los carneros resultan negativos a dos muestreos consecutivos, en un período de 60 días *West, D.M.1991. Robles, C. A.1992*.

Vacunación.

La vacunación es la única medida de control disponible en países con gran incidencia de infección por *B. ovis*, ya que en estas áreas la erradicación por medio de pruebas serológicas y eliminación de animales es económicamente impracticable *Blasco, 1990*.

Los estudios sobre vacunas para *B.ovis*, comenzaron en Nueva Zelanda. *Buddle 1956b y 1957* después de realizar varios estudios de campo concluyó que el único procedimiento que confería una protección significativa era inocular a los carneritos jóvenes simultáneamente con una vacuna preparada con *Brucella abortus* cepa 19 para bovinos y una vacuna en base a una cepa de *B. ovis* muerta en una emulsión de aceite mineral. Posteriormente, *Claxton 1968*, obtuvo similares resultados al evaluar 2 vacunas a germen muerto, disponibles en Australia.

Si bien la mayor parte de las vacunas utilizadas hasta el presente han demostrado proteger contra la infección por *B. ovis*, la mayoría posee la desventaja de inducir anticuerpos indistinguibles de los producidos por la infección natural acarreando confusión en el diagnóstico serológico de la enfermedad *Blasco y col., 1987*. Por esta razón, es importante el desarrollo de vacunas subcelulares, mediante la identificación de los antígenos de *B. ovis*, que induzcan una respuesta inmunitaria protectora sin interferir en el serodiagnóstico.

Las bacterinas (*B. ovis* inactivadas con formol), aplicadas por vía subcutánea, han sido las únicas vacunas específicas utilizadas para el control de la enfermedad. Estas, combinadas con adyuvantes del tipo oleoso, sales de aluminio o vitamina E han tenido limitada eficacia (Afzal y col., 1984b). Aunque la administración simultánea de la bacterina con la cepa 19 de *B. abortus* ha conferido una protección eficaz (70-90% de protección), ésta induce una respuesta serológica de larga duración y deja secuelas como la epifisitis, osteomielitis y epididimitis (Swift y Maki, 1968; West, 1978).

B. mellitensis Rev. 1, cepa atenuada lisa, ha sido considerada la mejor vacuna disponible para el control de las brucelosis ovinas y caprina (Alton y Elberg, 1967). Su utilización para proteger a los ovinos frente a la infección por *B. ovis* ha sido ampliamente estudiada en la República Sudafricana, país donde actualmente se aplica. Esta confiere una eficaz protección cruzada contra *B. ovis* (60-100%) pero induce la formación de anticuerpos anti-O lipopolisacárido que interfieren con el diagnóstico serológico (Blasco y col., 1987); por esta razón no se aconseja su administración en áreas libres de *B. mellitensis*.

La dosis estándar de *B. mellitensis* Rev. 1 es de $1-2 \times 10^9$ UFC/ml aplicada por vía subcutánea en animales entre los 3-8 meses de edad. Su utilización en animales sexualmente maduros induce una respuesta persistente que interfiere con el diagnóstico serológico, y puede provocar aborto en las hembras gestantes (Elberg, 1981) con excreción de la cepa vacunal. Se han buscado distintas estrategias para disponer de una vacunación exitosa en animales adultos a través del uso de una dosis vacunal reducida (Sales Henriques y col., 1992) y/o utilizando la vía de administración conjuntival (Marín y col., 1990; Zundel y col., 1992) con el objeto de reducir la duración de la respuesta serológica y disminuir el riesgo de aborto en caso de ser aplicada en hembras preñadas. La vacunación con dosis reducida (1×10^5 - 1×10^7 UFC/ml), vía subcutánea, ha ocasionado aborto en ovejas en el segundo o tercer mes de gestación. Por otro lado, la vacunación conjuntival con *B. mellitensis* Rev. 1 en dosis estándar o utilizando 1×10^8 UFC/ml ha protegido provocando una respuesta serológica de menor duración, presentando la ventaja de tener una fácil y práctica aplicación, aunque no resultó totalmente inocua en ovejas preñadas (Zundel y col., 1992).

Otras vacunas heterólogas probadas han sido las cepas *B. abortus* RB51 y *B. suis* cepa 2, las cuales si bien protegieron frente al desafío con *B. ovis* en el ratón; no lo hicieron adecuadamente en el ovino (*Blasco y col., 1993b; Jiménez de Bagués y col., 1995*).

En carneros, se ha estudiado en un mismo ensayo, la eficacia en la protección de diferentes preparaciones antigénicas obtenidas de *B. ovis* y vacunas con cepas heterólogas. Las fracciones utilizadas fueron el HS, el PG unido a PME y las PMEs libres del LPS-R, *B. abortus* 45/20 (cepa rugosa muerta) y *B. mellitensis* Rev. 1. La vacunación con el extracto HS confirió un nivel de protección semejante al obtenido con *B. mellitensis* Rev. 1 frente a *B. ovis* virulenta (*Blasco y col., 1993a*).

Pinochet. *et al., 1987* obtuvieron buenos resultados usando una vacuna comercial disponible comercialmente en Chile en base a *B. abortus* cepa 45/20 y a un tercio de la dosis para bovinos.

Van Drimmelen., desde 1960, evaluó varias vacunas en base a *B. abortus* cepa 19, otra a *B. mellitensis* REV I y una de *B. mellitensis* a germen muerto y expuso a los animales a una infección experimental.

La única que otorgó un 100% de protección fue la *B. mellitensis* REV I. Resultados similares fueron obtenidos luego por *Van Heerden y Van Rensburg 1962*, en Sudáfrica, *García Carrillo. 1981*, en Argentina, *Fensterbank et al., 1982* en Francia y por *Blasco et al., 1987*. En España. Todos los autores coinciden en que lo más recomendable es vacunar entre el destete y los 5 meses de edad.

Si bien la mayoría de las vacunas descritas hasta el presente han demostrado proteger contra la infección por *B. ovis*, la mayoría tienen algunas desventajas como ser la de producir anticuerpos indistinguibles de los producidos por la infección natural, acarreando confusión en el diagnóstico serológico de la enfermedad, o la imposibilidad de recomendar el uso de la REV I en áreas libres de *B. mellitensis*. *Claxton, P. D. 1968* *García Carrillo, C. 1981*.

Sin embargo esto no sería tan así a partir de que *Blasco et al., 1987* y *Fensterbank et al., 1982*. Demostraron que la cepa vacunal de *B. mellitensis* REV I no se excretaba en semen de carneros vacunados, ni pudo ser tampoco

aislada de los órganos en los que normalmente se asienta la infección por *B.ovis*. Trabajos más recientes de *Marin et al., 1990*. Con la vacuna REV I, demostraron que los títulos vacunales caían dramáticamente vacunando animales jóvenes usando la vía conjuntival.

Tratamiento.

Buddle reportó ya en 1957, que la aureomicina combinada con estreptomina era efectiva para eliminar la infección por *B.ovis*. Más recientemente el uso de la oxitetraciclina o la oxitetraciclina de larga duración combinada con dihidroestreptomina han demostrado ser igualmente efectivas para detener la eliminación de *B.ovis* por semen en carneros naturalmente infectados. Sin embargo el tratamiento es incapaz de resolver las epididimitis clínicas y las lesiones microscópicas características de la enfermedad *Dargatz, D. A.1990. Marin, C. M 1989b*.

REFERENCIAS.

1. Afzal, M.; Tengerdy, R.P.; Squire, P.G.; Ellis, R.P. (1984) Characterization of *Brucella ovis* lipopolisaccharide and its use for the diagnosis of ram epididymitis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*, **20**:1159-1164.
2. Afzal, M. y Kimberling, C. V. (1986) How to control *Brucella ovis*-induced epididymitis in rams. *Veterinary Medicine*, **81**:364-370.
3. Ajai, C.O.; Cook, J.E.; Dennis, S.M. (1980) Diagnosing ovine epididymitis by immunofluorescence. *The Veterinary Record*, **107**:421-424.
4. Alton, G.G.; Jones, L.M.; Angus, R.D.; Verger, J.M. (1988) Techniques for brucellosis laboratories. Ed: Inra, France. pp: 190.
5. Alton, G.G.; Jones, L.M.; Pietz, D.E. (1975) Laboratory techniques in Brucellosis. Who, Monograph series N° 55. Ed: WHO, Geneva, Switzerland. pp: 163.
6. Biberstein, E.L.; McGowan, B.; Olander, H.; Kennedy, P.C. (1964) Epididymitis in rams: Studies on pathogenesis. *Cornell Veterinarian*, **54**:27-41.
7. Blasco, J. M.; Marin, C. M.; Barberan, M.; Moriyon, I.; Diaz, R. (1987) Immunization with *Brucella mellitensis* REV I against *Brucella ovis* infection of rams. *Veterinary Microbiology*, **14**:381-392.
8. Blasco, J.M. (1990) *Brucella ovis*. In: *Animal Brucellosis*, Ed by Nielsen and Duncan. Boca Raton, Florida, USA. pp: 453
9. Blasco, J.M. Y Marin, C.M. (1990) Brucellosis ovina: Diagnóstico bacteriológico. *Ovis*, **8**:15-22.
10. Blasco, J.M.; Jiménez De Bagues, M.P. (1990) Brucelosis ovina: Diagnóstico serológico. *Ovis*, **8**:51-64.
11. Blasco, J.M. Y Barberan, M. (1990) Brucellosis ovina: Epidemiología, patógena y cuadro clínico. *Ovis*, **8**:25-32.
12. Brown, G. M.; Pietz, D. E.; Price, D. A. (1973) Studies on the transmission of *Brucella ovis* infection in rams. *Cornell Veterinarian*, **63**:29-40.
13. Burckrell, B. C.; McEwen, S. A.; Johnson, W. H.; Savage, N. C. (1985) Epididymitis caused by *Brucella ovis* in a southern Ontario sheep flock. *Canadian Veterinary Journal*, **26**:293-296.
14. Buddle, M.B.; Boyes, B.W. (1953) A brucella mutant causing genital disease of sheep in New Zealand. *The Australian Veterinary Journal*, **29**:145-153.
15. Buddle, M. B. (1955) Observations on the transmission of *Brucella* infection in sheep. *The New Zealand Veterinary Journal*, **3**:10-19.

16. Buddle, M. B. (1956a) Studies on *Brucella ovis* (N.SP.), a cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia. *The Journal of Hygiene*, **54**:351-364.
17. Buddle, M. B. (1956b) Ovine brucellosis in New Zealand. Proceedings of the III International Congress on Animal Reproduction, Cambridge, UK, **2**:37-38.
18. Buddle, M.B. (1957) Vaccination in the control of epididymitis in rams. Proceedings of Ruakura Farmers Conference, Week, New Zealand: 12-18.
19. Bulgin, M.S.; Anderson, B.C. (1983) Association of sexual experience with isolation of various bacteria in cases of ovine epididymitis. *Journal of The American Veterinary Medical Association*, **182**:372-374.
20. Bulgin, M.S. (1990a) *Brucella ovis* excretion in semen of seronegative, clinically normal breeding rams. *Journal of The American Veterinary Medical Association*, **196**:313-315.
21. Bulgin, M. S. (1990b) Epididymitis in rams and lambs. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, **6**:683-690.
22. Burgess, G. W.; McDonald, J. W.; Norris, M. J. (1982) Epidemiological studies on ovine brucellosis in selected ram flocks. *Australian Veterinary Journal*, **59**:45-47.
23. Burgess, G.W. And Norriss, M.J. (1982) Evaluation of the cold complement fixation test for diagnosis of ovine brucellosis. *Australian Veterinary Journal*, **59**:23-25.
24. Burgess, G.W. (1982) Ovine contagious epididymitis: A review. *Veterinary Microbiology*, **7**:551-575.
25. Burgess, G. W.; Spencer, T. L.; Norris, M. J. (1985) Experimental infection of goats with *Brucella ovis*. *Australian Veterinary Journal*, **62**:262-264.
26. Cameron, R. D. & Lauerman, L H. (1976) Characteristics of semen changes during *Brucella ovis* infection in rams. *The Veterinary Record*, **99**:231-233.
27. Cardenas, A.L.; Maki, L.R. (1986) Detection of antibody in rams with contagious epididymitis, using the enzyme-linked immunosorbent assay. *American Journal of Veterinary Research*, **47**:738-739.
28. Chin, J.C. (1983) Comparison of different antigenic preparations for the detection of ovine serum antibodies against *Brucella ovis* by ELISA. *Australian Veterinary Journal*, **60**: 261-264.
29. Claxton, P. D. (1968) *Brucella ovis* vaccination in rams. A comparison of two commercial vaccines and two methods of vaccination. *Australian Veterinary Journal*, **44**:48-54.

30. Cox, J.C.; Gorriet, J.R.; Nairn R.C.; Ward, H.A. (1977) A comparison of methods for the serological diagnosis of *Brucella ovis* infection. *British Veterinary Journal*, **133**:442-445.

30b. Durward M, et al., 2009. *Discordant Brucella mellitensis Antigens Yield Cognate CD8+ T cells in vivo. Infect Immun*, 2009.

30c. Da Costa Martins R, et al., 2009. Evaluación de partículas de vacunas acelulares contra la infección por *Brucella ovis* en carneros. *Vacuna*. 2009 Nov1.

31. Dargatz, D. A.; Smith, J.A. ; Knight, A.P. ; Farin, P.W.; Kimberling C.V. (1990) Antimicrobial therapy for rams with *Brucella ovis* infection of the urogenital tract. *Journal of The American Veterinary Medical Association*, **196**:605-610.

32. Diaz, R.; Garatea, P.; Jones, L.M.; Moriyon, I. (1979) Radial immunodiffusion test with *Brucella* polysaccharide antigen for differentiating infected from vaccinated cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, **10**:37-41.

33. Dragui, M. G.; Zurbriggen M. A.; Rochinotti, D.; Vanzini, V. R.; Homse, A. C.; Baez Kohn, A. R. (1984) Brucellosis ovina: Estudio serológico en 6 departamentos de la provincia de Corrientes, Argentina. *Veterinaria Argentina*, **1**:39-43.

34. FAO (1992) *Animal Health Yearbook. Animal production and health series. N° 32*, pp: 271. Ed. FAO/OIE/WHO.

35. Fekete, A.; Bantle, J.A.; Halling, S.M.; Sanborn, M.R. (1990) Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. *Journal of Applied Bacteriology*, **69**:216-227.

36. Fensterbank, R.; Pardon, P.; Marly, J. (1982) Efficacy of *Brucella mellitensis* REV I vaccine against *Brucella ovis* infection in rams. *Annales Recherche Veterinaire*, **13**:185-190.

37. Foster, R. A.; Ladds, P. W.; Briggs, G. D.; Hoffmann, D. (1987) Pathology of the accessory sex glands of rams infected with *Brucella ovis*. *Australian Veterinary Journal*, **64**:248-250.

38. Foster, R.A.; Ladds, P.W.; Hoffman, D; Gleeson, L. J. (1988) Identification of *Brucella ovis* in formalin-fixed paraffin-embedded genital tissues of naturally infected rams by the indirect peroxidase-antiperoxidase technique. *Australian Veterinary Journal*, **65**:324-326

39. Garcia Carrillo, C. (1981) Protection of rams against *Brucella ovis* infection by *Brucella mellitensis* REV 1 vaccine. *Zbl. Veterinary Medicine B*, **28**:425-431.

40. Hopper, B.R.; Sanborn, M.R. Bantle, J.A. (1989) Detection of *Brucella abortus* in mammalian tissues using a biotinylated whole genomic DNA as a molecular probe. *Journal of the American Veterinarian Medical Association*, **50**:2064-2070.
41. Hajdu, S. (1962) Serological investigation and control of infectious epididymitis and ovine brucellosis in Slovakia. *Arch. Exp. Vet. Med*, **16**:19-28. In: *Veterinary Bulletin* (1962) **32**:664.
42. Hartley, W. J.; Jebson, J. L.; McFarlane, D. (1955) some observations on natural transmission of ovine brucellosis. *The New Zealand Veterinary Journal*, **3**: 5-10.
43. Haughey, K. G.; Hughes, K. L.; Hartley, W. J. (1968) *Brucella ovis* infection. 2. The infection status in breeding flocks as measured by examination of rams and the perinatal lamb mortality. *Australian Veterinary Journal*, **44**:531-535.
44. Hicks, J. D.; Burr, G. R.; Marshall, D. R.; Vidler, B. M. (1978a) CFT inaccurate for epididymitis. *New Zealand Veterinary Journal*, **26**:34.
45. Hicks, J. D.; Burr, G.R.; Marshall, D. R.; Vidler, B. M. (1978b) CFT inaccurate for epididymitis. *New Zealand Veterinary Journal*, **26**: 135.
46. Jansen, B.C. (1980a) The pathology of bacterial infections of the genitalia in rams. *Onderstepoort Journal Veterinary Research*, **47**: 263-267.
47. Jansen, B.C. (1980b) The a etiology of ram epididymitis. *Onderstepoort Journal Veterinary Research*, **47**: 101-107.
48. Jebson, J. L.; Hartley, W. J.; McFarlane, D. (1954) The artificial infection of sheep with a *Brucella*-like organism. Part II: The artificial infection of rams. *The New Zealand Veterinary Journal*, **2**: 85-89.
49. Jones, L.M.; Dubray, G.; Marly, J. (1975). Comparison of methods of diagnosis of *Brucella ovis* infection of rams. *Annual Recherche Veterinaire*, **6**:11-22.
50. Kennedy, P.C.; Frazier, L.M.; McGowan, B. (1956) Epididymitis in rams: Pathology and bacteriology. *Cornell Veterinarian*, **46**:303-319.
51. Kimberling, C.V. & Schweitzer, D. (1989) *Brucella ovis* infection and its management in ovine reproduction. *Agri-Practice*, **10**:36-39.
52. Kott, R.W.; Halver, G.C.; Firehammer, B.; Thomas, V.M. (1988) Relationships between *Brucella ovis* semen culture and various semen and serology parameters. *Theriogenology*, **29**:961-970.
53. Lawrece, W. E. (1961) Ovine Brucellosis: A review of the disease in sheep manifested by epididymitis and abortion. *British Veterinary Journal*, **117**:435-447.

54. Laws, L.; Simmons, G. C.; Ludford, C. G. (1972) Experimental *Brucella ovis* infection in rams. *Australian Veterinary Journal*, **48**:313-317.
55. Lee, K.; Cargill, C.; Atkinson, H. (1985) Evaluation of an enzyme linked-immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *Australian Veterinary Journal*, **62**: 91-93.
56. Lozano, E. A. (1986) Etiologic significance of bacterial isolates from rams with palpable epididymitis. *American Journal of Veterinary Research*, **47**:1153-1156.
57. Marco J.; Gonzalez, L.; Cuervo, L.A.; Beltran De Heredia, F; Barberan, C.; Marin, C; Blasco, J.M. (1994) *Brucella ovis* infection in two flocks of sheep. *The Veterinary Record*, **135**: 254-256
58. Marin, C. M.; Jimenez De Bagues, M.P.; Blasco, J.M.; Gamazo, C.; Moriyon, I.; Diaz, R. (1989a) Comparison of three serological tests for *Brucella ovis* infection of rams using different antigenic extracts. *The Veterinary Record*, **125**:504-508.
59. Marin, C. M.; Jimenez De Bagues, M.; Barberan, M.; Blasco, J. M. (1989b) Efficacy of long-acting oxytetracycline alone or in combination with streptomycin for treatment of *Brucella ovis* infection of rams. *American Journal Veterinary Research*, **50**:560-563.
60. Marin, C.M.; Barberan, M.; Jimenez De Bagues, M.; Blasco, J.M. (1990) Comparison of subcutaneous and conjunctival routes of REV I vaccination for the prophylaxis of *Brucella ovis* infection in rams. *Research in Veterinary Sciences*, **48**:209-215.
61. McFarlane, D.; Salisbury, R.M.; Osborne, H.V. Jebson, J.L. (1952) Investigation into sheep abortion in New Zealand during the 1950 lambing season. *The Australian Veterinary Journal*, **28**:221-226.
62. McGowan, B. & Shultz, G. (1956) Epididymitis of rams: Clinical description and field aspects. *Cornell Veterinarian*, **46**:277-281.
63. Meinershagen, W.A.; Frank, F. W.; Waldhalm, D. G. (1974) *Brucella ovis* as a cause of abortion in ewes. *American Journal of Veterinary Research*, **35**:723-724.
64. Moro, M.S. (1974) *Brucellosis ovina producida por brucella ovis*. Centro Panamericano de Zoonosis, OPS/WHO. Ramos Mejia, Argentina. Pp: 39
65. Moriton, I. y Gamazo, C. (1990) Estructura antigénica de *Brucella mellitensis* y *Brucella ovis*. *Ovis*, **8**:35-49.
66. Myers, D.M. & Siniuk, A.A. (1970) Preliminary report on the development of a diffusion-in-gel method for the diagnosis of ram epididymitis. *Applied Microbiology*, **19**:335-337.

67. Myers, D.M. (1973) Field evaluation of the gel diffusion test for the diagnosis of ram epididymitis caused by *Brucella ovis*. *Applied Microbiology*, **26**:855-857.
68. Myers, D.M. & Varela-Diaz, V. (1979) Serodiagnosis of ram epididymitis by Counter-immunoelectrophoresis, using *Brucella ovis* surface R antigen. *Journal of Clinical Microbiology*, **10**:451-453.
69. Nicoletti, P. (1989) Brucellosis in animals. In: *Brucellosis*, Ed: Madkour (Butterworths, UK)
70. Niilo, L. (1984) Diagnosis of Ovine Brucellosis. *Canadian Veterinary Journal*, **25**:118-119.
71. Niilo, L.; MacDonald, D. W.; Godkin, G.F.; Stone, M.W. (1986) Ovine brucellosis in Alberta. *Canadian Veterinary Journal*, **27**:245-249.
72. Osborne, H. G. (1955) Epididymitis in rams. *The Australian Veterinary Journal*, **31**:11-13.
73. Pinochet, L. V.; Pinto, A.; Sanchez, M. L.; Bertolino, M. R. (1987) Brucelosis ovina. Vacunación con cepa 45/20 adyuvante. *Avances en Ciencias Veterinarias*, **2**:47-50.
74. Plant, J. W.; Eamens, G. J.; Seaman, J. T. (1986) Serological, bacteriological and pathological changes in rams following different routes of exposure to *Brucella ovis*. *Australian Veterinary Journal*, **63**:409-412.
75. Rahaley, R.S.; Dennis, S.M.; Smeltzer, M.S. (1983) Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay and complement fixation test for detecting *Brucella ovis* antibodies in sheep. *The Veterinary Record*, **113**: 467-470.
76. Riezu-Boj, J.I.; Moriyon, I.; Blasco, J.M.; Marin, C.M., Diaz, R. (1986) Comparison of lipopolysaccharide and outer membrane protein-lipopolysaccharide extracts in an Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella ovis* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, **23**:938-942.
77. Ris, D.R. & Te Punga, W.A. (1963) An indirect haemagglutination test for the detection of *Brucella ovis* antibodies. *The New Zealand Veterinary Journal*, **11**: 94-97.
78. Ris, D.R. (1964) An indirect haemagglutination test for the detection of *Brucella ovis* antibodies. *New Zealand Veterinary Journal*, **12**:72-75.
79. Ris, D.R.; Hamel, K.L.; Long, D.L. (1984) Comparison of an enzyme-linked immunospecific assay (ELISA) with the cold complement fixation test for the serodiagnosis of *Brucella ovis* infection. *New Zealand Veterinary Journal*, **32**:18-20.
80. Robles, C.A. (1989) Técnica de revisión del carnero. Serie técnica. Ed. INTA Bariloche, Argentina: 12.

81. Robles, C.A.; Urcullu, J.A.; Uzal, F.A. (1990) Primer diagnóstico en Patagonia de orquiepididimitis en carneros por Bacilos Pleomórficos Gram negativos. *Veterinaria Argentina*, **7**:453-455.
82. Robles, C. A. (1992) Infectious epididymo-orchitis in lambs and rams. Present situation and control proposal in Argentina. *Proceedings of the World Sheep & Wool Congress, August 9th-16th, Buenos Aires, Argentina.* :323-333.
83. Robles, C. A; La Torraca, A.; Sancholuz, M.; Uzal, F. A.; Evans, E. (1993).- Brucelosis ovina en majadas merino de la provincia de Chubut, Argentina. *Veterinaria Argentina*, **10**:458-461.
84. Robles, C. A. (1994) contagious epididymitis in rams due to *Brucella ovis*: An epidemiological study in a flock in Patagonia region, Argentina. University of Edinburgh, Scotland (UK) M.Sc. Thesis.
85. Romero, C.; Gamazo, C.; Pardo, M.; Lopez-Goñi, I. (1995) Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, **33**:615-617.
86. Searson, J.E. (1986) Distribution of *Brucella ovis* in tissues of rams reacting in a complement fixation test for ovine brucellosis. *Australian Veterinary Journal*, **63**:30-31.
87. Searson, J.E. (1987) The distribution of histopathological lesions in rams reacting in a complement fixation test for *Brucella ovis*. *Australian Veterinary Journal*, **64**:108.
88. Simmons, G. C. & Hall, W.T. (1953) Epididymitis in rams. *The Australian Veterinary Journal*, **29**:33-40.
89. Spencer, T.L.; Burgess, G.W. (1984) Enzyme-linked immunosorbent assay for *Brucella ovis* specific antibodies in ram sera. *Research in Veterinary Science*, **36**:194-198.
90. Stamp, J.T.; McEwen, A.D.; Watt, J.A.; Nisbet, D.T. (1950) Enzootic abortion in ewes. 1- Transmission of the disease. *The Veterinary Record*, **62**:251-254.
91. Terzolo, H.R.; Paolichi, F.A.; Moreira, A.R.; Homse, A. (1991) Skirrow agar for simultaneous isolation of *Brucella* and *Campylobacter* species. *The Veterinary Record*, **129**:531-532.
92. Van Drimmelen, G. C. (1960) Control of Brucellosis in sheep and goats by means of vaccination. *Journal of South African Veterinary Medical Association*, **31**:129-138.
93. Van Heerden, K. M. & Van Rensburg, S. W. J. (1962) The immunization of rams against ovine brucellosis. *Journal of South African Veterinary Medical Association*, **33**:143-148

94. Van Rensburg, S. W.; Van Heerden, K. M.; Le Roux, D. J.; Snyders, A. J.; Van Heerden, K. M. (1958) Infectious infertility in sheep. *Journal of South African Veterinary Medical Association*, **29**:223-233.
95. Van Tonder, E. M. (1977) Examination of rams for genital soundness. *Journal of South African Veterinary Medical Association*, **48**:267-272.
96. Van Tonder E. M. (1982) Bacterial infections of the genital organs of rams. *Proceedings of the Veterinary Approach to Flock Health*, 2-4 March, University of Pretoria, South Africa.
97. Wallaceville Animal Research Centre (1983) The complement fixation test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *New Zealand Veterinary Journal*, **31**:157-160.
98. Watt, D.A. (1972) Testicular abnormalities and spermatogenesis of the Ovine and other species. *The Veterinary Bulletin*, **42**:181-189.
99. Webb, R.F.; Quinn, C.A.; Cockram, F.A.; Husband, A.J. (1980) Evaluation of procedures for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *Australian Veterinary Journal*, **56**:172-175.
100. West, D.M.; Bruere, A.N. (1979) Accreditation for freedom from ovine brucellosis. *New Zealand Veterinary Journal*, **27**:263-265.
101. West, D.M.; Bruere, A.N. (1991) Observations on the eradication of *Brucella ovis* infection from a ram flock. *New Zealand Veterinary Journal*, **39**:29-31.
102. Worthington, R.W.; Van Tonder, E.M.; Mulders, M.S. (1972) The incidence of *Brucella ovis* infection in South African rams: A serological survey. *Journal of South African Veterinary Association*, **43**:83-85.
103. Worthington, R.W.; Weddell, W.; Penrose, M.E. (1984) A comparison of three serological tests for the diagnosis of *B. ovis* infection in rams. *New Zealand Veterinary Journal*, **32**:58-60.
104. Worthington, R.W.; Stevenson, B.J.; De Lisle, G.W. (1985) Serology and semen culture for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in chronically infected rams. *New Zealand Veterinary Journal*, **33**:84-86.