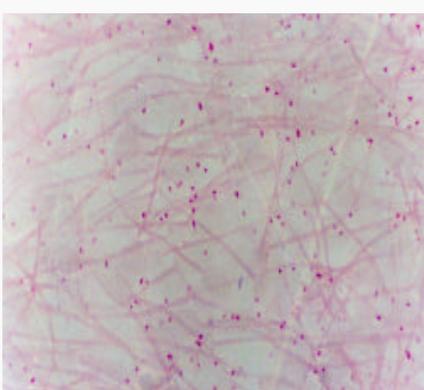
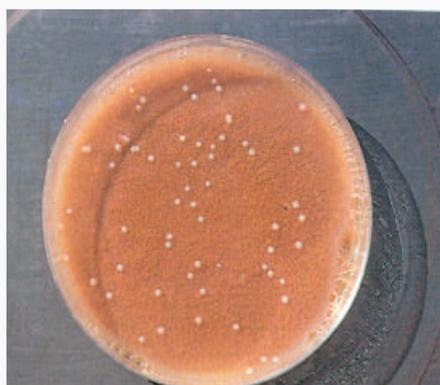
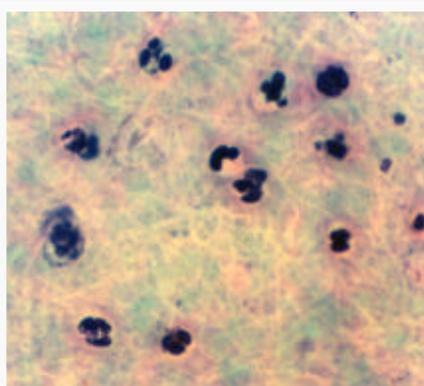


Brucelosis en Carneros por *Brucella ovis*

Dr. Carlos Robles
Grupo Salud Animal - INTA Bariloche



▪ **Ediciones**
Instituto Nacional de
Tecnología Agropecuaria

SIRSA
Sistema Integrado Regional
de Salud Animal



BRUCELOSIS EN CARNEROS por *Brucella ovis*

Carlos A. Robles, M.V. - M.Sc.

**Grupo de Salud Animal
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
Estación Experimental Agropecuaria Bariloche
CC: 277 (8400) Bariloche, ARGENTINA
Tel: 02944 - 422731
Fax: 02944 - 424991
e-mail: crobles@bariloche.inta.gov.ar**

Título: Brucelosis en carneros por *Brucella ovis*

Title: Brucellosis in rams due to *Brucella ovis*

Autor de textos y fotos: Carlos A. Robles

Méd. Vet. Universidad Nacional de La Plata.

M.Sc. Tropical Veterinary Medicine - University of Edinburgh - Scotland - UK

1^{ra} edición 2008

Editor: Carlos A. Robles

Robles, Carlos

Brucelosis en carneros por *Brucella ovis*. 1a ed. - Bariloche: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - INTA, EEA Bariloche, 2008. 27 p.; 18x25 cm.

ISBN 978-987-521-298-5

1. Brucelosis. I. Título

CDD 636.208

Reservados todos los derechos de la presente edición para todos los países. Este libro no podrá ser reproducido total o parcialmente por ningún método gráfico, electrónico, mecánico o cualquier otro, incluyendo sistemas de fotocopia y fotoduplicación, registro magnetofónico o alimentación de datos, sin expreso consentimiento del autor y editor.

Hecho el depósito que prevé la ley 11.723

INDICE

INTRODUCCION	5
1. ETIOLOGIA	6
2. PATOGENESIS	7
3. ASPECTOS CLINICOS	8
4. PATOLOGIA	9
5. EPIDEMIOLOGIA	11
6. DIAGNOSTICO	13
7. VACUNAS	20
8. PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA BRUCELLOSIS	21
9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES FINALES	23
10. BIBLIOGRAFIA PARA CONSULTAR	24
11. APENDICE 1: Técnicas de laboratorio para <i>Brucella ovis</i>	26
12. APENDICE 2: Planilla para envío de información y sueros al laboratorio	27

INTRODUCCION

La Brucelosis de los ovinos es una enfermedad infecto-contagiosa producida por **Brucella ovis**. La infección es de curso crónico y clínicamente, se caracteriza por la presencia de epididimitis y semen de mala calidad en machos, aborto en hembras y aumento de la mortalidad perinatal.

A diferencia del resto de las brucellas que pueden afectar a varias especies animales y al ser humano, **B. ovis** afecta solamente al ovino y hasta el presente no se han registrado casos en humanos.

La presencia de **B. ovis** en una majada produce un impacto negativo en la rentabilidad de la explotación debido a:

1. una caída en la fertilidad de la majada.
2. un aumento en el descarte de carneros infectados.
3. acortamiento de la vida reproductiva de los machos.
4. pérdida de animales de alto valor genético a causa del descarte.
5. abortos.
6. aumento de la mortalidad perinatal.
7. complicaciones en el manejo a raíz de la presencia de la enfermedad.
8. restricciones en el comercio.
9. menos ingresos por venta de reproductores y germoplasma.
10. pérdidas económicas por erogaciones innecesarias en tratamientos, análisis de sangre y honorarios profesionales.
11. desprestigio de la cabaña o establecimiento.

1. ETIOLOGIA

El organismo causal de la enfermedad, **Brucella ovis**, fue aislado por primera vez en Nueva Zelandia por McFarlane y col. en 1952 a partir de ovejas abortadas.

En 1953, Simmons y Hall en Australia y Buddle y Boyes en Nueva Zelandia reportan simultáneamente la epididimitis en carneros por **B. ovis**.

En 1956, Kennedy la reporta por primera vez en América.

En 1961 Szyfres & Chappel aislan **Brucella ovis** por primera vez en Argentina, a partir del semen de un carnero con epididimitis.

Posteriormente la infección por **B. ovis** es reportada en casi todas las provincias criadoras de ovinos en Argentina.

Brucella ovis es un cocobacilo pequeño Gram negativo, no capsulado, que mide entre 0.7 μ a 1.2 μ de largo por 0.5 μ a 0.7 μ de ancho. Se tiñe de rosado con la coloración de Gram y de rojo con la coloración de Ziehl Neelsen modificada por Stamp (Foto 1). (Ver Apéndice 1).

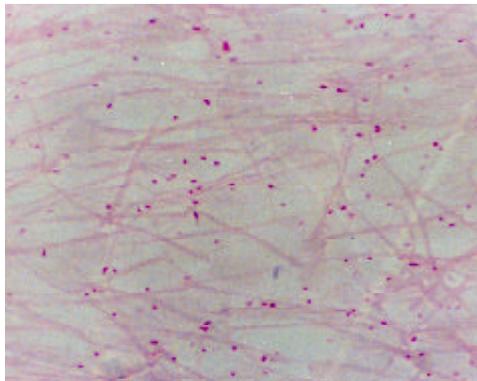


Foto 1: Extendido de semen donde pueden observarse espermatozoides de fondo y puntos color rojos fuerte correspondientes a **Brucella ovisteñidas** con la coloración de Stamp.

Crece bien en medios basales como el tripticasa-soya, agar sangre y agar columbia, enriquecidos con un 7% a 10% de suero o sangre en una atmósfera con un 10% a 20% de Dióxido de carbono y hasta el presente se ha descrito una única biovariedad.

A diferencia de las brucellas clásicas (**B. abortus**, **B. melitensis** y **B. suis**) que son lisas, **B. ovis** es del tipo rugoso. Ello se debe fundamentalmente a diferencias en la conformación de la membrana externa de la bacteria y trae como consecuencias, entre otras cosas, que los test serológicos basados en la aglutinación como el Rosa de Bengala, BPA, Aglutinación en tubo con 2 Mercaptoetanol, etc., no puedan ser utilizados para el diagnóstico de la enfermedad en el carnero, pues **B. ovis** no genera aglutinación.

2. PATOGENESIS

Brucella ovis, entra al organismo a través de las membranas mucosas como son la mucosa bucal, nasal, conjuntival, prepucial, etc.

Una vez atravesada la mucosa y siguiendo el curso de los linfáticos aferentes, la bacteria llega a los ganglios linfáticos regionales y de allí, vía sanguínea invade todo el organismo.

Hacia el final del segundo mes post exposición, **B. ovis** desaparece de ganglios linfáticos y otros órganos pudiendo ser encontrada principalmente en vesículas seminales, glándulas bulbouretrales, ampollas de los conductos deferentes y epidídimos.

Cuando **B. ovis** se establece en los epidídimos, genera una reacción inflamatoria caracterizada por edema perivascular e infiltración celular del tejido conectivo. Se produce hiperplasia del epitelio de los túbulos epidí-

dimarios 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 en respuesta a la liberación de ácido micólico por parte de los espermatozoides lisados.

Las vesículas seminales y las ampollas parecen ser el asiento más común de la infección por **B. ovis**. Esto explicaría la presencia de carneros positivos a la serología de **B. ovis**, pero sin lesiones palpables en los órganos reproductivos.

En la Tabla 1 se pueden ver datos obtenidos en Patagonia de 78 carneros positivos a **B. ovis**. Sólo el 28% de los carneros positivos demostraron lesiones palpables a la revisión clínica.

Tabla 1: Presencia de lesiones epididimarias en 78 carneros positivos a **Brucella ovis**.

	Epididimitis		Total
	Con lesiones	Sin lesiones	
Serologia (+) a B. Ovis	22 (28%)	56 (72%)	78

Adaptado de Robles y col, Vet. Res. Comm (1998)

Brucella ovis se puede aislar en carneros a partir de semen, epidídimo, testículo, vesículas seminales, ampollas de los conductos deferentes, glándulas bulbo-uretrales, hígado, riñón, bazo y ganglios linfáticos regionales. De todos

ellos, la seminal es la vía más importante de excreción de la bacteria y de transmisión de la enfermedad.

El epidídimo puede estar totalmente afectado, pero la situación más común

que hemos visto en Patagonia, es que esté afectada la cola del epidídimo. En la Tabla 2 se pueden observar los resultados de un estudio realizado sobre

75 carneros naturalmente infectados con *B. ovis*, que presentaron lesiones a la palpación clínica.

Tabla 2: Distribución de las lesiones en epidídimos de carneros naturalmente infectados con *Brucella ovis*

	Cantidad	%
Cabeza	1	1.3
Cuerpo	3	4
Cola	52	69.3
Cabeza y cuerpo	3	4
Cola y cuerpo	5	6.6
Epidídimo complete	11	14.7
TOTAL	75	

Adaptado de Robles y col, Vet. Res. Comm. (1998)

3. ASPECTOS CLINICOS

Usualmente el primer síntoma de la enfermedad en detectarse a campo es la epididimitis, sin embargo esto corresponde a un estadio ya crónico de la enfermedad.

Los síntomas clínicos iniciales, como son fiebre, desgano, respiración agitada e inflamación del escroto y su contenido, pasan generalmente desapercibidos.

No se sabe con certeza cuánto tardan en aparecer las primeras lesiones palpables en epidídimos en condiciones naturales de infección a campo. Sin embargo en forma experimental se ha demostrado, que tras la inoculación de *B. ovis* vía conjuntival, las lesiones aparecen entre 15 y 45 días, post inoculación.

Pasado el período agudo, las lesiones palpables que suele generar la enfermedad consisten en un aumento del tamaño y de la consistencia del o los epidídimos, atrofia uni o bilateral de los testículos y adherencias entre las capas vaginal y parietal de la túnica vaginal.

Si bien los carneros afectados mantienen una líbido normal, la calidad del semen generalmente no es buena, pudiéndose detectar baja concentración y motilidad de los espermatozoides, un aumento de los defectos de cola y cabezas y presencia de neutrófilos.

4. PATOLOGIA

4.1. Patología macroscópica

Los cambios patológicos en carneros están prácticamente restringidos al tracto genital, involucrando principalmente los epidídimos, los testículos y las glándulas sexuales accesorias.

Los hallazgos macroscópicos en una etapa ya crónica de la enfermedad consisten en aumento del tamaño de alguna de las partes del epidídimo (cabeza, cuerpo y/o cola) o bien puede estar afectado todo el órgano con atrofia testicular y adherencias (Fotos 2 y 3).



Foto 2: Aspecto de testículos y epidídimos de un carnero normal.



Foto 3: Aspecto de testículos y epidídimos en un ~~carnero afectado por~~ *Brucella ovis*. Puede observarse el aumento de tamaño de la cola del epidídimo derecho y atrofia del testículo del mismo lado.

El epidídimo o la parte del mismo que esté afectada estará aumentada de tamaño, firme al tacto y con un contorno anormal (Foto 4). Al cortar el órgano aparecen abscesos o granulomas con un contenido cremoso o caseoso y es comprobable un fuerte aumento del tejido conectivo intersticial (Foto 5).



Foto 4: Obsérvese el aumento de tamaño, forma anormal y fibrosis presente en la cola del epidídimo izquierdo.

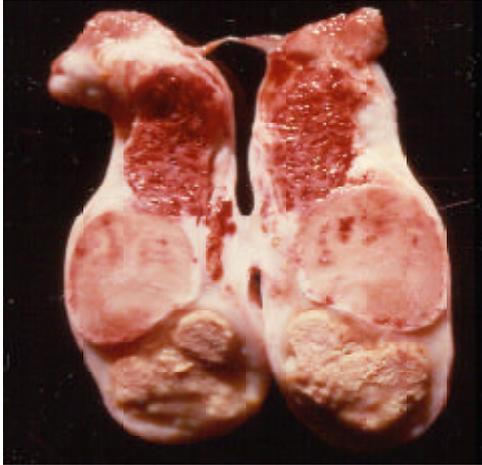


Foto 5: Cola de epidídimo de un carnero con brucelosis donde pueden observarse granulomas o abscesos con material cremoso en su interior y un aumento del tejido conectivo.



Foto 6: Adherencias entre las hojas de la túnica vaginal en un carnero naturalmente infectado por ***Brucella ovis***.

Es frecuente el hallazgo de adherencias entre el epidídimo con el testículo y la túnica vaginal, que hacen que los testículos no se desplacen libremente dentro de la cavidad escrotal (Foto 6).

A nivel testicular los cambios son generalmente secundarios a aquellos de los epidídimos. La atrofia testicular es el hallazgo más común y es más severa en aquellos casos donde hubo gran cantidad de adherencias (Fotos 3 y 5).

4.2. Patología microscópica

Las lesiones microscópicas en los epidídimos consisten en edema intersticial con infiltración de linfocitos y células plasmáticas. También es característico de la infección por ***Brucella ovis*** la metaplasia y la hiperplasia focal del epitelio epididimal con la formación de vesículas intraepiteliales con acumulación de neutrófilos dentro de las mismas (Foto 7).

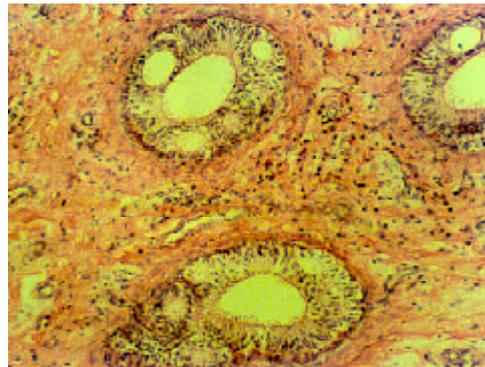


Foto 7: Al microscopio pueden observarse los túbulos epididimarios, con presencia de vesículas en el epitelio de los mismos y un aumento del tejido conectivo intertubular.

Como resultado del edema intersticial y cambios en el epitelio se produce un angostamiento y obliteración de la luz del tubo epididimal con éstasis espermático dando lugar a la formación de granulomas o abscesos espermáticos (Foto 5). Estos 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.

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 del epitelio, y procesos de fibrosis e hiperplasia epitelial con vesículas intra epiteliales, similares a lo observado en epidídimo.

5. EPIDEMIOLOGIA

5.1. Transmisión natural

La infección natural por *B. ovis* se da solamente en el ovino y principalmente por la vía venérea debido a la actividad sexual entre machos y hembras, pero también entre machos y machos.

En nuestros sistemas extensivos de cría, el contagio se produce básicamente en 2 épocas:

a. Contagio en la época pre-servicio

En este caso es una transmisión básicamente de macho a macho. Aproximadamente un mes antes del inicio del servicio, los carneros entran en celo desmostrando una alta libido y adoptando una serie de actitudes y actividades homosexuales, como son la monta entre ellos, olfatearse o lamersse el prepucio y pene entre ellos, etc. (Fotos 8 y 9).



Foto 8: Carnero lamiendo el prepucio de otro carnero en la época pre-servicio.



Foto 9: Obsérvese la expresión y la forma que toman la boca y ollares del carnero (Flehmen) en la época del pre-servicio e intento de monta a otro macho.

Es en estos momentos donde por estas vías la enfermedad se transmite en forma directa entre los machos. Por ello en cualquier programa de control, es importante no juntar los carneritos nuevos que van a entrar a su primer servicio con el lote de carneros ya adultos en la época del pre-servicio, ya que corren un alto riesgo de ser infectados en esta época.

b. Contagio durante el servicio

La transmisión es de tipo indirecta en donde una hembra sana actúa en forma pasiva como intermediaria de la infección entre dos o más machos. El contagio se produce cuando un carnero sano monta una oveja sana, que fue previamente montada por un carnero infectado, el cual depositó en su vagina

semen infectado. Esto no implica que la oveja se vaya a enfermar, pues para que la hembra desarrolle la enfermedad, debería estar preñada, cosa que no ocurre durante el servicio.

c. Otras formas de transmisión: No ha sido posible demostrar hasta el momento la transmisión de la enfermedad de ovejas infectadas a ovejas sanas y por ovejas infectadas, de una estación reproductiva a la próxima. Tampoco se ha podido demostrar infección en carneros y ovejas preñadas que estuvieron pastoreando en pasturas contaminadas.

5.2. Infección artificial de ovinos con *Brucella ovis*

Experimentalmente, *Brucella ovis* ha sido transmitida por inoculación endovenosa, inoculación intratesticular e intraepididimal y subcutáneamente. También por instilación de semen infectado y/o cultivos de la bacteria a través de las mucosas bucal, conjuntiva ocular, la mucosa nasal, mucosa prepucial, proceso uretral, pene y la mucosa rectal.

5.3. Susceptibilidad según diferentes razas

Respecto a la susceptibilidad de diferentes razas ovinas a la enfermedad, no se han encontrado diferencias en varias razas como la Suffolk, Hampshire, Merino, Karakul, Persas y Doper. Sin embargo Hajdu (1962) reporta que la incidencia de *Brucella ovis* fue más alta en las razas Tsigai y

Valachian que en Merino. Blasco y Barberán (1990) también observaron en España una menor incidencia en Merino y razas derivadas del Merino, que en otras razas europeas como la Suffolk, Ile de France y Romanov. En nuestro país no se han publicado estudios al respecto, pero la información diagnóstica acumulada en nuestros registros por más de 20 años revela que las prevalencias promedio son mayores en las majadas Corriedale del sur de Santa Cruz y Tierra del Fuego que en las majadas Merino de Rio Negro, Neuquén y Chubut. Sin embargo al tratarse de ambientes tan diferentes, no se puede aseverar que dicho fenómeno se deba exclusivamente a la raza.

5.4. Susceptibilidad según la edad

En situaciones de infección natural a campo, *Brucella ovis* se aísla comúnmente de carneros adultos con experiencia sexual previa y muy raramente en animales jóvenes. Blasco y Barberán (1990) después de analizar en España los datos de 2500 carneros concluyeron que el porcentaje de carneros infectados con *Brucella ovis* aumentaba a medida que aumentaba la edad. Sin embargo, en un estudio que realizamos en la provincia de Santa Cruz, donde se controlaron los 600 carneros de un establecimiento durante 3 años pudo establecerse, que la prevalencia de la enfermedad no dependía directamente de la edad, sino más bien de la actividad sexual y/o libido de los carneros.

5.5. Susceptibilidad según el sexo

En opinión de varios autores las hembras son más resistentes a la enfermedad que los machos y son los machos los que difunden la infección en el establecimiento, ya que las hembras,

bajo condiciones extensivas de manejo, como las que tenemos en Patagonia, pareciera que son incapaces de infectar a otros animales adultos de la majada, ya sea machos o hembras.

6. DIAGNOSTICO

A diferencia de lo que ocurre con la brucelosis bovina, en los ovinos, quien mantiene la enfermedad es el carnero y es también quien la transmite dentro de la majada y de un campo a otro. Por esta razón el diagnóstico de la Buceiosis ovina por *Brucella ovis* se realiza fundamentalmente en los machos.

El diagnóstico de infección por *B. ovis* en carneros se basa en (1) la revisión clínica del aparato reproductor del carnero (2) el aislamiento de la bacteria de semen o tejidos y (3) la detección de anticuerpos específicos contra *B. ovis* en el suero sanguíneo del animal.

6.1. Revisación clínica

La palpación de los órganos genitales externos, permite el diagnóstico de la epididimitis, que es una de las manifestaciones clínicas de la infección por *B. ovis*. (Fotos 10 y 11).



Foto 10: Posición del carnero para proceder a la revisión clínica de ganglios, testículos y epidídimos.



Foto 11: Revisación de la bolsa escrotal y su contenido: testículos y epidídimos.

Si bien la técnica es barata y fácil de llevar a cabo, los resultados nunca son concluyentes debido a que:

- a. hay otros organismos como ***Actinobacillus seminis***, ***Histophilus ovis***, ***Corynebacterium spp***, ***Escherichia coli***, ***Pasteurella spp***, etc., que también producen epididimitis palpables.
- b. no todos los carneros infectados desarrollan epididimitis.
- c. algunos carneros infectados y con síntomas a la revisión clínica, pueden estar clínicamente normales al practicarse una nueva revisión clínica unas semanas o meses más tarde.

A pesar entonces de que la revisión clínica no es muy efectiva para detectar los animales infectados por ***Brucella ovis***, siempre se debe revisar clínicamente a todos los carneros al menos una vez al año entre uno y dos meses antes de iniciarse el servicio, ya que no solo permite detectar a los animales que presentan epididimitis por diversas causas infecciosas (entre ellas *Brucella*) sino también detectar otro tipo de anomalías de tipo congénito o adquiridas (criptorquidia, fimosis, orquitis, abscesos escrotales, balanopostitis, etc) que también afectan la salud del carnero y por lo tanto su eficiencia reproductiva.

6.2. Aislamiento y detección de *Brucella ovis* en semen y tejidos

a. Bacterioscopía

La tinción de improntas de semen o tejidos con las coloraciones de Gram y de Ziehl-Neelsen modificada (Stamp) pueden demostrar la presencia de cocobacilos pequeños teñidos de rosado (Gram) o de rojo vivo (Ziehl Neelsen mod.), lo cual, en forma presuntiva, puede estar indicando la presencia de ***Brucella ovis*** (ver Foto 1). Con esta misma coloración o con la coloración de Giemsa x 15 minutos, se puede detectar la presencia de células inflamatorias en el semen, básicamente neutrófilos (Foto 12), lo cual si bien no nos identifica ningún agente causal, nos está indicando de que hay una infección en el tracto genital. Por su simplicidad, es ésta, una técnica que debiera usarse de rutina en la evaluación del semen de carneros donantes en programas de Inseminación Artificial o padres de cabaña antes de iniciar el servicio.

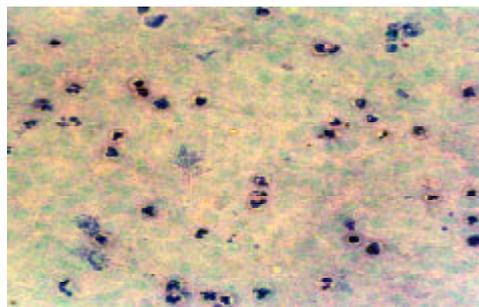


Foto 12: Extendido de semen teñido con la Col. de Ziehl-Neelsen modificada. Obsérvese la presencia de células inflamatorias teñidas de violeta oscuro.

b. Aislamiento de *Brucella ovis*

La forma más práctica para lograr el aislamiento de *B. ovis*, para fines diagnósticos en carneros es a través del cultivo bacteriológico 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.

Una vez extraído el semen en forma higiénica y con materiales estériles, mediante el uso de vagina artificial o un electroeyaculador, las muestras de semen deben enviarse refrigeradas si llegan al laboratorio en un plazo no mayor a las 12 horas. De lo contrario se recomienda congelarlas y enviarlas luego bien acondicionadas en conservadora de telgopor con abundantes refrigerantes.

Para el cultivo de semen se recomienda utilizar Agar sangre y en paralelo el medio selectivo de Thayer-Martin modificado para *Brucella ovis* (Ver Apéndice 1). La incubación se realiza a 37°C en una atmósfera conteniendo entre un 10 a 20% de Dióxido de carbono y las

placas se deben incubar por lo menos 7 días (Foto 13).

Cada vez que se comience a trabajar con brucelosis ovina en un establecimiento o una región es aconsejable intentar el aislamiento del agente actuante para determinar inicialmente si se trata de *B. ovis* o de *B. melitensis* que también infecta al ovino y en el caso de ser *B. ovis*, poder comparar la cepa aislada localmente, con las cepas internacionales de referencia.

c. Detección de *Brucella ovis* mediante otras técnicas

Actualmente hay otras técnicas que si bien no permiten el aislamiento de la bacteria viva, permiten determinar su presencia con bastante seguridad. Una de ellas es la técnica de Peroxidasa anti-peroxidasa basada en la reacción antígeno-anticuerpo.

La otra técnica y la de mayor auge en este momento es la llamada «Reacción en cadena de la Polimerasa» conocida más comúnmente por sus siglas en el idioma inglés como PCR (Polymerase Chain Reaction). Esta técnica consiste en la identificación de una secuencia específica del genoma de *Brucella ovis* en una muestra (por ejemplo semen) de un animal infectado (Foto 14).



Foto 13: Cultivo de *Brucella ovis* a partir de muestras de semen, en medio de Thayer-Martin modificado.

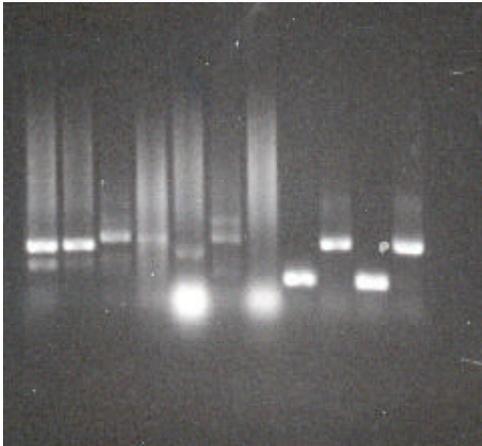


Foto 14: Técnica de PCR. En la foto puede observarse un gel con diferentes bandas. Las dos primeras bandas de la izquierda corresponden a **Brucella abortus** y **Brucella ovis**, mientras que el resto de las bandas corresponden a otras bacterias gram negativas.

6.3. Detección de anticuerpos contra **Brucella ovis**

La detección de anticuerpos contra **B. ovis** en un animal se realiza a través de pruebas inmunológicas o «serológicas» como comúnmente se las conoce. Estas pruebas están basadas en el hecho de que si el animal está infectado, en consecuencia tiene que haber producido anticuerpos contra **B. ovis**, es decir que se trata de una forma indirecta de saber si un animal está infectado o no.

Para ello se deben tomar muestras de sangre de los animales, extraer el suero, congelarlo y enviarlo al laboratorio junto con los datos del animal.

En razón de que **B. ovis** tiene una membrana externa diferente a las demás brucelas, las técnicas serológicas usadas para el diagnóstico de la brucelosis bovina o caprina, no sirven para su aplicación en el diagnóstico de **Brucella ovis** en el carnero.

Para esta enfermedad las pruebas serológicas más usadas han sido la Fijación del complemento y la Inmunodifusión en gel de agar con antígenos específicos para **Brucella ovis**.

Actualmente la prueba de elección es el test de Elisa indirecto (Foto 15), el cual ofrece no solo una mejor sensibilidad y especificidad que las pruebas anteriores, sino que tiene una serie de ventajas como son: lectura totalmente objetiva pues se realiza con un espectrofotómetro (Foto 16), se utilizan cantidades mínimas de reactivos y de suero, parte o toda la técnica se puede automatizar permitiendo procesar una mayor cantidad de muestras por día, en cada placa siempre van incluidos 3 sueros controles, lo que otorga una gran seguridad sobre la marcha de la prueba y los resultados obtenidos, etc.

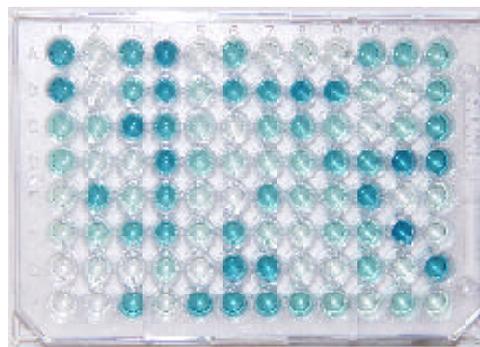


Foto 15: En la foto puede observarse una placa de Elisa con los resultados a la vista. La primera fila de la izquierda, corresponde a sueros controles colocados por duplicado y el resto corresponden a sueros problemas, donde a simple vista pueden verse sueros positivos a **Brucella ovis**, ello indicado por un color verde oscuro de la muestra.



Foto 16: Lector de Elisa que se utiliza para leer las placas de Elisa, lo cual permite obtener una lectura objetiva y cuantificada de los resultados.

Por la facilidad de obtener la muestra y la rapidez relativa de ejecución de los análisis, el diagnóstico serológico es el más usado para diagnosticar la enfermedad a campo y es la herramienta básica usada para el control de la enfermedad.

Obtención de suero sanguíneo para el análisis serológico de *Brucella ovis*

Es importante conocer algunas precauciones que deben tomarse, a fin de que las muestras sean debidamente extraídas, identificadas, conservadas y enviadas para su análisis.

Las muestras de sangre deben extraerse en forma cuidadosa observando una serie de factores cuales son: temperatura del tubo al momento de extraer la muestra, calibre de la aguja, que tanto agujas, como jeringas y tubos estén perfectamente limpios y secos, etc.

Es importante que las muestras de suero lleguen al laboratorio libres de hemólisis, autólisis y/o putrefacción, pues en esas situaciones, los resultados no serán confiables.

Son causa de hemólisis:

- * Aspiración vigorosa con jeringa
- * Jeringa, aguja o tubo mojados
- * Tubos mal lavados y/o mal enjuagados
- * Tubos muy fríos
- * Agitación del tubo con la sangre

a. Preparación del material

Los tubos de vidrio deben estar perfectamente limpios. Lo ideal es recolectar la sangre en tubos que luego puedan ser centrifugados, en caso de que el coágulo no se desprende naturalmente. Para el lavado recomendamos dejar el material en remojo por un día en lavandina, luego lavar con agua y detergente, enjuagar varias veces con agua de canilla hasta que no queden restos de detergente (espuma) y dar un último enjuague con agua destilada o desmineralizada si fuera posible. Dejar escurrir los tubos boca abajo en una gradilla a temperatura ambiente hasta que estén totalmente secos. Colocar tapón de goma y rotular con etiqueta autoadhesiva o cinta de enmascarar. Para escribir los tubos de sangrar o tubitos de suero, recomendamos hacerlo con marcador indeleble color negro y de trazo grueso.

b. Técnica de sangrado

Con el carnero de pie y utilizando un rincón del corral, se lo encaja de nalgas en el mismo, se lo toma por la cabeza y se la levanta levemente hacia arriba y a la derecha (Foto 17).



Foto 17: Técnica para la extracción de sangre, de la vena yugular, con el carnero en pie.

El operario se coloca en cuclillas delante del carnero y munido de un tubo de sangrar y una aguja hipodérmica 50 x 20 o 16G x 2, sangra al animal (Foto 17).

Para introducir la aguja en la vena es necesario comprimir con la mano izquierda la vena yugular a nivel de la entrada del pecho y esperar que la misma se ingurgite.

Luego, con los dedos mayor y anular de la mano derecha se palpa la zona hasta que se detecta la vena tensa y en ese momento y sin disminuir la presión que estamos ejerciendo sobre la vena, procedemos a clavar la aguja, con el bisel hacia arriba.

Una vez que atravesamos la vena, dejamos correr el primer chorrillo de sangre y luego recién colocamos el tubo para juntar la sangre. El tubo debe mantenerse inclinado para que la sangre deslice por un costado del mismo a fin de que el suero no se hemolice ni forme espuma.

Antes de tomar la muestra de sangre, el tubo tiene que estar tibio. Para ello es recomendable tener los tubos en una caja de telgopor con una bolsa de agua caliente en su interior e ir sacándolos de a uno. Llenar el tubo de sangre en sus 2 (dos) tercios y evitando movimientos bruscos, volver a colocar en la gradilla dentro de la caja de telgopor con la bolsa de agua caliente, cuidando que esta última no toque los tubos, porque en ese caso la sangre se «cocinaría».

Se recomienda usar una aguja por animal. Lo ideal son las descartables, pero si usa las de metal, recuerde que entre un animal y otro debe desinfectarlas cuidadosamente con una solución de desinfectante. Se recomiendan los productos a base de Iodo-povidona. Para un enjuague efectivo, acoplar una jeringa y realizar varias aspiraciones de la solución, y expirar con fuerza para lograr el arrastre de restos de sangre coagulada y/o fibrina en el interior de la aguja.

c. Obtención, acondicionamiento y conservación del suero

Trás unas horas de reposo a temperatura ambiente (> de 22°C) y una vez que el coágulo se ha retraído, liberando el suero, separar el suero en un tubito plástico lo antes posible (máximo 24 horas de extraída la sangre) y congelarlo a -20°C hasta su envío al laboratorio. De lo contrario el suero entra rápidamente en descomposición y los resultados no

serán confiables. Si algún tubo no dió suero o el mismo está turbio o sanguinolento, se puede obtener suero o clarificar el mismo, centrifugando el tubo a 1500/2000 rpm por 15 minutos. Enviar los sueros congelados en conservadora de telgopor entre dos o más capas de refrigerantes o congelantes.

d. Envío de las muestras al laboratorio

Enviar preferentemente entre lunes y jueves. Una vez enviadas las muestras, sugerimos avisar por fax, teléfono o mail el nombre del transporte por el que fueron enviadas las muestras, que día fueron despachadas y el número de la guía de envío (Factura), a fin de que el laboratorista pueda reclamar la encomienda en el transporte sin que se generen dudas.

6.4. Recomendaciones generales para el Diagnóstico de *B. ovis*

No hay ninguna manera conocida hasta el presente que permita en un solo muestreo poder detectar el 100% de los carneros infectados a *Brucella ovis*. Ello se debe a una serie de factores:

a. No existe ninguna prueba clínica, serológica ni bacteriológica que tenga un 100% de sensibilidad (habilidad de una técnica de detectar como positivos a todos los animales infectados) ni 100% de especificidad (habilidad de una

técnica de detectar como negativos a todos los animales sanos).

b. Hay carneros infectados que nunca van a demostrar anticuerpos y por lo tanto van a ser negativos a la serología.

c. Hay carneros infectados que no siempre expulsan brucellas en el semen

d. Hay carneros infectados que nunca van a desarrollar lesiones en epidídimo y/o testículo.

e. Hay animales que al momento del muestreo, han sido recientemente infectados, quizá el día anterior, y por lo tanto no tienen ni lesiones, ni anticuerpos antibrucella.

f. Quedan carneros en el campo que faltan al muestreo y entre ellos puede haber carneros infectados, que seguirán manteniendo la infección. Por ello es importante tenerlos todos caravaneados y emplanillados, para poder controlar que están todos en cada muestreo.

A partir entonces de esta realidad, es importante dejar asentado que a pesar de que en un chequeo saquemos de la majada todos los animales que dieron un resultado positivo o tenían lesiones, siempre nos estarán quedando animales infectados que las pruebas no detectarían en ese momento y por lo tanto habrá que establecer un calendario con varios muestreos periódicos para lograr eliminar, en el tiempo, todos los carneros infectados de la majada.

7. VACUNAS

La vacunación es el método más económico y práctico para controlar la **infección por *Brucella ovis*** en los sistemas extensivos de cría, donde no es fácil juntar periódicamente los animales para sangrado y control y donde los servicios veterinarios y de laboratorios de diagnóstico son escasos, como sería el caso de las áreas extra-pampeanas de nuestro país.

Los estudios sobre vacunas para ***Brucella ovis***, comenzaron en Nueva Zelanda donde Buddle (1956 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 ***Brucella ovis*** muerta en una emulsión de aceite mineral. Posteriormente, Claxton (1968) obtuvo similares resultados al evaluar 2 vacunas a germen muerto, disponibles en Australia.

Pinochet y col. (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.

En Sud África, Van Drimmelen (1960) evaluó varias vacunas en base a ***B. abortus*** cepa 19, otra a ***B. melitensis*** REV I y una de ***B. melitensis*** a germen muerto y expuso a los animales a una infección experimental. La única que otorgó un 100% de protección fue la ***B. melitensis*** REV I. Resultados similares

fueron obtenidos luego por Van Heerden y Van Rensburg (1962) en Sud África, Garcia Carrillo (1981) en Argentina, Fensterbank y col. (1982) en Francia y por Blasco y col. (1987) en España. Todos los autores coinciden en que lo más recomendable es vacunar entre el destete y los 5 meses de edad.

La vacuna ***Brucella melitensis*** REV I es una vacuna a germen vivo atenuado desarrollada por Elberg y colaboradores entre 1953 y 1955 en California para su uso en ovinos y caprinos. Es estable y tiene escasa virulencia para los animales, pero es patógena para el ser humano si éste llegara a inocularse accidentalmente.

Si bien ha demostrado proteger contra la infección por ***Brucella ovis***, tiene 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 (Garcia Carrillo, 1981; Claxton, 1968; Blasco y col. 1987). Sin embargo trabajos más recientes de Fensterbank y col (1982) **y de Marin y col. (1990)** con la vacuna REV I, demostraron que esto se solucionaba vacunando los carneritos jóvenes usando la vía conjuntival en vez de la vía inyectable.

En la actualidad la vacuna ***Brucella melitensis*** REV I es la vacuna de elección para la prevención y control de la brucelosis ovina.

Sin embargo ni la vacuna *Brucella melitensis* REV I, ni ninguna otra vacuna, ha sido aprobada en nuestro país para ser usada en el control de la brucelosis ovina por *Brucella ovis*, lo cual nos priva por el momento de utilizar esta herramienta para el control de la brucelosis.

Ello nos obliga a trabajar en el control de la enfermedad mediante las otras herramientas disponibles cuales son el diagnóstico, el descarte de los animales positivos, cambios en el manejo de los carneros, que si bien permiten el control de la enfermedad son mucho más caras y difíciles de implementar en nuestros sistemas extensivos de cría.

8. PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA BRUCELLOSIS

La primera recomendación para cualquier productor de ovinos, es realizar un sangrado de todos los carneros y retajos para saber si tiene la enfermedad en el campo. Si tiene la enfermedad, sugerimos comenzar con un plan de control y si está libre de ella implementar un plan preventivo para evitar ingresar la enfermedad al establecimiento.

8.1. Plan preventivo para evitar ingresar la enfermedad en un establecimiento libre

Como dijimos anteriormente, al no tener la posibilidad por el momento, de usar vacunas para inmunizar y proteger a nuestros animales contra la enfermedad, la prevención básicamente la tenemos que realizar mediante (1) medidas de manejo para evitar el ingreso de la enfermedad a nuestro establecimiento a través del ingreso de un animal infectado y (2) estar atentos a cualquier signo que pueda estar indicando que entró la enfermedad a la majada, de tal manera que podamos detectarla en forma temprana y no

cuando la enfermedad ya se haya distribuido al resto de los carneros.

Para ello podemos sugerir:

- a. Mantener el total de los carneros y retajos perfectamente identificados, si es posible con doble caravana y mantener una planilla con el listado actualizado de carneros y retajos.
- b. Anualmente, antes del servicio revisar clínicamente la totalidad de los carneros en busca de lesiones epididimarias y testiculares.
- c. Anualmente entre las 6 y 8 semanas de finalizado el servicio, sangrar la totalidad de los carneros y retajos para realizar los análisis de *Brucella ovis*.
- d. Mantener en buen estado el alambrado perimetral del campo para que (a) no ingrese ningún animal de un campo vecino que pudiera estar infectado (b) para que no se escape un animal nuestro a un campo vecino, donde se puede infectar y luego volver a nuestro campo ingresando la infección.

e. Cuarentena de cualquier carnero que vayamos a comprar. Por ser la brucelosis ovina una enfermedad crónica, la única forma de estar seguros de que el animal que vamos a comprar está libre de brucelosis, es que provenga de un establecimiento certificado como «libre de brucelosis». Como en nuestro país no hay aún establecimientos certificados como «libres de brucelosis» no podemos contar con esta posibilidad. Entonces lo que nos queda por hacer es que al comprar un reproductor de cualquier establecimiento vendedor, sometamos al animal o animales a un proceso de cuarentena. La cuarentena para esta enfermedad consiste en revisar clínicamente y realizar análisis serológico contra *Brucella ovis* del animal que vamos a comprar. Si el resultado de ambas pruebas fuera negativas, llevar el carnero a nuestro establecimiento y mantenerlo por el término de 4 a 6 semanas en un corral aislado del resto de los carneros. Pasados los 30 días del primer sangrado en el establecimiento de origen, se procede a una segunda revisión clínica en busca de lesiones testiculares o epididimarias y a un nuevo sangrado. Si ambas pruebas resultan nuevamente negativas, recién allí procedemos a darle entrada oficial a dicho animal al establecimiento y comenzar a usarlo. De todas maneras, debe quedar claro que con la cuarentena, lo que hacemos es disminuir las chances de que el animal esté infectado, pero nunca lograremos el 100% de seguridad de que no esté infectado, ya que ello solo se puede obtener, como dijimos antes, cuando compramos en un establecimiento «certificado oficialmente como libre de brucelosis ovina».

f. Cualquier reproductor que salga de nuestro establecimiento, ya sea a una exposición rural o prestado a otra cabaña o establecimiento para servicio a corral o para extracción de semen, etc, al reingresar a nuestro campo, debería pasar por el sistema de cuarentena como ya se explicó anteriormente.

8.2. Plan para controlar la Brucelosis ovina en un establecimiento infectado

Al igual que en el caso anterior al no disponer de una vacuna que pueda ser usada para inmunizar los animales y de esta manera poder interrumpir la transmisión de la enfermedad, para el control entonces de la enfermedad a nivel predial debemos recurrir a otras herramientas sanitarias y de manejo y a la identificación y descarte de los animales infectados.

Para ello podemos sugerir:

a. Mantener todo el lote de carneros perfectamente identificados, si es posible con doble caravana y mantener una planilla con el listado actualizado de carneros y retajos. Boquear a todos los animales y registrar la edad. Es imprescindible tener todos los carneros y retajos caravaneados, de tal manera que (1) se los pueda identificar correctamente, y (2) poder controlar en los sucesivos muestreos que se vayan realizando, que siempre estén todos los carneros y retajos. Este es un tema de máxima importancia, ya que si quedan algunos carneros en el campo, puede haber entre ellos animales infectados que mantendrán la enfermedad y serán fuente de contagio para los animales sanos.

b. Mantener en buen estado el alambrado perimetral del campo para que (a) no ingrese ningún animal de un campo vecino que pudiera estar infectado (b) para que no se escape un animal nuestro a un campo vecino, donde se puede contaminar y luego volver a nuestro campo ingresando la infección.

c. Establecer un calendario de revisiones clínicas con sangrados que deberán iniciarse entre 6 a 8 semanas de finalizado el servicio y repetirse cada 60 días hasta bajar la prevalencia a los valores deseados o erradicación de la enfermedad, según el objetivo de trabajo que se haya consensuado con el propietario de los animales.

d. Las actividades a desarrollar en los muestreos consistirán en revisar clínicamente y sangrar la totalidad de los carneros y retajos. Una vez que se tengan los resultados de ambos análisis (clínico y serológico) descartar inmediatamente todos los animales que ha-

yan presentado lesiones a la revisión clínica, todos aquellos que hayan resultado positivos a la serología de ***Brucella ovis*** y todos aquellos que hayan resultado positivos a ambas cosas: presencia de lesiones y serología positiva.

e. Los animales para descartar deben ser apartados y mantenidos en aislamiento, hasta tanto se los saque del establecimiento con destino a faena en matadero o frigorífico o a consumo dentro del mismo establecimiento, lo antes posible. Es importante aclarar que el consumo de carne de animales infectados por ***Brucella ovis*** no genera ningún riesgo para la salud humana. También es importante tener en cuenta que con la castración de los carneros infectados, no se evita que éstos continúen infectados o transformados en retajos, en razón de que la infección no solo está en los epidídimos y testículos, sino que también está en vesículas seminales, conductos deferentes, ganglios, etc.

9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES FINALES

1. Según el nuevo código de la OIE, la brucelosis de los carneros por ***Brucella ovis***, es una enfermedad de declaración obligatoria a nivel internacional por lo que sería importante comenzar a preocuparnos por esta enfermedad y difundir el control de la misma.

2. La Brucelosis ovina está presente y ampliamente distribuida en el país y con prevalencias altas en muchas regiones, como es la Patagonia, donde se estima que entre el 8% y 10% de los carneros están infectados, habiéndose detecta-

do establecimientos con hasta el 60% de los carneros infectados.

3. Las pérdidas económicas son importantes por el descarte de carneros valiosos, baja señalada y por complicar el comercio de reproductores, semen y embriones.

4. Son muy pocos aún, los establecimientos que llevan adelante un programa de control de la enfermedad. En este sentido, las cabañas y todos aquellos establecimientos vendedores de carneros, debieran liderar la campaña.

5. Sería deseable contar a futuro con una legislación adecuada que permita (1) el uso de vacunas para la prevención de la enfermedad y (2) poder certificar los establecimientos saneados, como libres de Brucelosis.

6. Es necesaria una mayor difusión entre productores y veterinarios privados, sobre los principales aspectos de la enfermedad, su diagnóstico y como controlarla.

El INTA Bariloche, ofrece asistencia técnica y entrenamiento a todos los veterinarios que quieran llevar adelante un programa de Prevención y/o control de la Brucelosis ovina. Asimismo, brinda un servicio de diagnóstico de laboratorio que incluye la realización de cultivos bacteriológicos para aislamiento de *Brucella ovis*, y análisis serológicos mediante el test de Elisa indirecto, convenientemente estandarizado.

10. BIBLIOGRAFÍA PARA CONSULTAR

1. AFZAL, M. y KI MBERLI NG, CV. (1986) How to control *Brucella ovis*-induced epididymitis in rams. *Veterinary Medicine*, **81** :364-370.
2. BI BERSTEIN, EL; McGOWAN, B; OLANDER, H; KENNEDY, PC. (1964) Epididymitis in rams: Studies on pathogenesis. *Cornell Veterinarian*, **54** :27-41.
3. BLASCO, JM. y BARBERAN, M. (1990) Brucellosis ovina: Epidemiología, patogenia y cuadro clínico. *Ovis*, **8**:25-32.
4. BROWN, G.M.; PI ETZ, DE; PRI CE, DA. (1973) Studies on the transmission of *Brucella ovis* infection in rams. *Cornell Veterinarian*, **63** :29-40.
5. BUCKRELL, BC; McEWEN, SA; JOHNSON, WH; SAVAGE, NC. (1985) Epididymitis caused by *Brucella ovis* in a southern Ontario sheep flock. *Canadian Veterinary Journal*, **26** :293-296.
6. BUDDLE, MB; BOYES, BW. (1953) A brucella mutant causing genital disease of sheep in New Zealand. *The Australian Veterinary Journal*, **29** :145-153.
7. BUDDLE, MB. (1955) Observations on the transmission of *Brucella* infection in sheep. *The New Zealand Veterinary Journal*, **3** :10-19.
8. BUDDLE, MB. (1956) Ovine brucellosis in New Zealand. *Proceedings of the III International Congress on Animal Reproduction*, Cambridge, UK, **2** :37-38.
9. BUDDLE, MB. (1957) Vaccination in the control of epididymitis in rams. *Proceedings of Ruakura Farmers Conference*, Week, New Zealand : 12-18.
10. BULGIN, MS. (1990) *Brucella ovis* excretion in semen of seronegative, clinically normal breeding rams. *Journal of The American Veterinary Medical Association*, **196** :313-315.
11. BULGIN, MS. (1990) Epididymitis in rams and lambs. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, **6** :683-690.
12. 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.
13. BURGESS, GW. (1982) Ovine contagious epididymitis: A review. *Veterinary Microbiology*, **7** :551-575.
14. CAMERON, RD. & LAUERMAN, LH. (1976) Characteristics of semen changes during *Brucella ovis* infection in rams. *The Veterinary Record*, **99** :231-233.
15. CLAXTON, PD. (1968) *Brucella ovis* vaccination in rams. A comparison of two commercial vaccines and two methods of vaccination. *Australian Veterinary Journal*, **44** :48-54.
16. FENSTERBANK, R; PARDON, P; MARLY, J. (1982) Efficacy of *Brucella melitensis* REV I vaccine against *Brucella ovis* infection in rams. *Annales Recherche Veterinaire*, **13** :185-190.
17. GALL, D; NI ELSEN, K; VI GLIOCCO, A; SMI TH, P; PREZ, B.; ROJAS, X; ROBLES, C. (2003) Evaluation of an indirect Enzyme-linked Immunoassay for the presumptive serodiagnosis of *Brucella ovis* in sheep. *Small Ruminants Research*. **48** :173-179.

18. GARCIA CARRILLO, C. (1981) Protection of rams against *Brucella ovis* infection by *Brucella melitensis* REV 1 vaccine. *Zbl. Veterinary Medicine B*, **28** :425-431.
19. 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.
20. HARTLEY, WJ; JEBSON, JL; McFARLANE, D. (1955) Some observations on natural transmission of ovine brucellosis. *The New Zealand Veterinary Journal*, **3** :5-10.
21. JANSEN, BC. (1980) The aetiology of ram epididymitis. *Onderstepoort Journal Veterinary Research*, **47** :101-107.
22. JONES, LM; DUBRAY, G; MARLY, J. (1975). Comparison of methods of diagnosis of *Brucella ovis* infection of rams. *Annual Recherche Veterinaire*, **6** :11-22.
23. KENNEDY, PC; FRAZIER, LM; McGOWAN, B. (1956) Epididymitis in rams: Pathology and bacteriology. *Cornell Veterinarian*, **46** :303-319.
24. MARIN, CM; JIMENEZ DE BAGUES, MP; BLASCO, JM; GAMAZO, C; MORIYON, I; DIAZ, R. (1989) Comparison of three serological tests for *Brucella ovis* infection of rams using different antigenic extracts. *The Veterinary Record*, **125** :504-508.
25. MARIN, CM; BARBERAN, M; JIMENEZ DE BAGUES, M; BLASCO, JM. (1990) Comparison of subcutaneous and conjunctival routes of REV 1 vaccination for the prophylaxis of *Brucella ovis* infection in rams. *Research in Veterinary Sciences*, **48** :209-215.
26. McFARLANE, D; SALISBURY, RM; OSBORNE, HV; JEBSON, JL. (1952) Investigation into sheep abortion in New Zealand during the 1950 lambing season. *The Australian Veterinary Journal*, **28** :221-226.
27. McGOWAN, B. & SHULTZ, G. (1956) Epididymitis of rams: Clinical description and field aspects. *Cornell Veterinarian*, **46** :277-281.
28. MEINERSHAGEN, WA; FRANK, FW; WALDHALM, DG. (1974) *Brucella ovis* as a cause of abortion in ewes. *American Journal of Veterinary Research*, **35** :723-724.
29. NIILLO, L. (1984) Diagnosis of Ovine Brucellosis. *Canadian Veterinary Journal*, **25** :118-119.
30. PINOCHET, LV; PINTO, A; SANCHEZ, ML; BERTOLINO, MR. (1987) Brucelosis ovina. Vacunación con cepa 45/20 adyuvante. *Avances en Ciencias Veterinarias*, **2** :47-50.
31. PLANT, JW; EAMENS, GJ; SEAMAN, JT. (1986) Serological, bacteriological and pathological changes in rams following different routes of exposure to *Brucella ovis*. *Australian Veterinary Journal*, **63** :409-412.
32. RAHALEY, RS; DENNIS, SM; SMELTZER, MS. (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.
33. ROBLES, CA. (1989) Técnica de revisión del carnero. Serie técnica. Ed. INTA Bariloche, Argentina. pp: 12.
34. ROBLES, CA; URCULLU, JA; UZAL, FA. (1990) Primer diagnóstico en Patagonia de orquiepididimitis en carneros por Bacilos Pleomórficos Gram negativos. *Veterinaria Argentina*, **7** :453-455.
35. ROBLES, CA. (1992) Infectious epididymo-orchitis in lambs and rams. Present situation and control proposal in Argentina. Proceedings of the World Sheep & Wool Congress, August 16th-16th, Buenos Aires, Argentina. :323-333.
36. ROBLES, CA; LA TORRACA, A; SANCHOLUZ, M; UZAL, FA; EVANS, E. (1993). Brucelosis ovina en majadas merino de la provincia de Chubut, Argentina. *Veterinaria Argentina*, **10** :458-461.
37. ROBLES, CA. (1998) Epididimitis contagiosa de los carneros por *Brucella ovis*. *Revista de Medicina Veterinaria*. 79 (1) :67-71.
38. ROBLES, CA; UZAL, FA; OLAECHEA, FV; LOW, C. (1998) Epidemiological observations in a Corriedale flock affected by *Brucella ovis*. *Veterinary Research Communications*, **22** :435-443.
39. ROBLES, CA. (2004) Salud Reproductiva del Cordero. Ed. INTA Bariloche. ISBN 987-521-039-0. Pag: 40.
40. SIMMONS, GC. & HALL, WT. (1953) Epididymitis in rams. *The Australian Veterinary Journal*, **29** :33-40.
41. VAN DRIMMELEN, GC. (1960) Control of Brucellosis in sheep and goats by means of vaccination. *Journal of South African Veterinary Medical Association*, **31** :129-138.
42. VAN HEERDEN, K.M. & VAN RENSBURG, SWJ. (1962) The immunization of rams against ovine brucellosis. *Journal of South African Veterinary Medical Association*, **33** :143-148
43. WEST, DM; BRUERE, AN. (1991) Observations on the eradication of *Brucella ovis* infection from a ram flock. *New Zealand Veterinary Journal*, **39** :29-31.
44. WORTHINGTON, RW; WEDDELL, W; PENROSE, ME. (1984) A comparison of three serological tests for the diagnosis of *B. ovis* infection in rams. *New Zealand Veterinary Journal*, **32** :58-60.

APENDICE 1: Técnicas de laboratorio para *Brucella ovis*

Medio de Thayer-Martin modificado para el aislamiento de *B. ovis*

(Fórmula utilizada en el INTA Bariloche - Robles, 1995)

Componentes del medio

- Agar Brucella o Agar Columbia (c.s. para 1 litro de medio de cultivo final)
- 7% de Sangre estéril con anticoagulante
- Mezcla de antibióticos*

**Mezcla de antibióticos*

Código	Antibiótico	Para 1 litro de medio	Preparación
Sigma No. V-2002	Vancomicina	3 mg	Resuspender cada uno en 1 ml de Metanol al 50% en agua destilada estéril
Sigma No. C-1511	Colistina	7.5 mg	
Sigma No. N-3503	Nistatina	22 mg	
Sigma No. N-7878	Nitrofurantoina	10 mg	Resuspender en 1 ml de Hidróxido de sodio 0.1 molar

Ref: J.D. Thayer, J.E. Martin (1964) A selective medium for the cultivating of *N. gonorrhoeae* and *N. meningitidis*. Publ. Health Dpt. U.S., **79**:49.

Coloración de Ziehl Neelsen, modificada por Stamp para *Brucella*

Ref: 1) Brucelloses Animales- Techniques de laboratoire. Garin-Bastuji, B. y Trap, D. Editions C.N.E.V.A., 1990. France.

2) Stamp; Mc Ewen; Watt; Nisbet (1950). Enzootic abortion in ewes. Vet Rec, 62 :251-254.

Técnica

1. Secar las improntas o frotis de semen y fijarlos a la llama
2. Teñir por 15 minutos con una solución de carbol fucsina diluida en agua destilada 1:5 en el momento de usar.
3. Lavar en agua corriente
4. Diferenciar con Acido acético al 3% por unos 30 segundos
5. Lavar rápidamente en agua corriente
6. Contrastar con Azul de metileno al 1% por 1 a 2 minutos

Interpretación: Las brucellas se verán como pequeños coco-bacilos color rojo fuerte.

