

EPIDIDIMITIS CONTAGIOSA DE LOS CARNEROS POR *BRUCELLA OVIS***C. A. Robles¹****Palabras clave:** Reproducción - Carneros - Epididimitis - *Brucella ovis* - Ovinos.

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. 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.

Key words: Reproduction - Ram - Epididymitis - *Brucella ovis* - Sheep.**SUMMARY
CONTAGIOUS EPIDIDYMITIS IN RAMS DUE TO *BRUCELLA OVIS***

Contagious epididymitis by *Brucella ovis* was first reported in Australia and New Zealand in 1953. At present it is wide distributed in all sheep-producing countries. As other Brucellas, *Brucella ovis* penetrates the animal through the mucous membranes, and after invading the blood stream it finally colonise the genital tract. Clinically the disease is characterised by chronic epididymitis and semen of poor quality. Lesions consisted in local inflammatory changes. The indirect venereal route seems to be the most common way of infection and diffusion of the disease. The diagnosis of the disease can be achieved through the detection and isolation of *Brucella ovis*, the detection of lesions in the target organs, changes in semen quality and serological tests. The fixation of complement, agar gel immunodiffusion and ELISA are the tests reported as the most used. For the control of the disease REV I vaccine has demonstrated to be the most effective despite it presents some practical inconvenience. This paper is also available in English.

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^(88, 48, 16, 50, 26, 46, 22) y en las hembras por aborto y aumento de la mortalidad perinatal^(61, 14, 6, 69).

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^(43, 64, 2, 71, 51).

ETIOLOGÍA - El organismo causal, *Brucella ovis*, fue aislado por primera vez en Nueva Zelandia 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 Zelandia. En 1956 es reportada por primera vez en América⁽⁵⁰⁾ y en 1961 en Argentina, Szyfres & Chappel aislan *B.ovis* del semen de un carneros con epididimitis.

Brucella ovis es un cocobacilo Gram negativo, no capsulado que mide entre 0.7µ a 1.2 µ de largo por 0.5µ a 0.7 µ de ancho. Se tiñe de rojo con la coloración de Ziehl Neelsen modificada⁽⁹⁰⁾ y se tiñe de azul con la coloración de Koster modificada^(14, 4). Crece bien en medios basales como el tripticasa-soya, agar sangre y agar columbia, enriquecidos con 7% de suero o sangre desfibrinada en una atmósfera con un 10% a 20% de Dióxido de carbono y hasta el presente hay una sola biovariedad descrita para *B.ovis*^(16, 4, 8).

PATOGENESIS - *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⁽²⁰⁾. Una vez atravesada la mucosa y siguiendo el curso de los linfáticos aferentes, la bacteria llega a los ganglios linfáticos regionales⁽⁶⁾. De allí y vía sanguínea la bacteria invade todo el organismo infectando el tracto genital, hígado, bazo, pulmones, riñón y otros ganglios linfáticos⁽⁶⁾. 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 bulbouretrales, ampollas de los conductos deferentes y a veces en riñón^(6, 20, 8).

¹ Méd. Vet., M.Sc. Grupo de Salud Animal - INTA. CC: 277 (8400) Bariloche, ARGENTINA Fax: 0944-24991 - E-Mail barisan@inta.gov.ar

MICROBIOLOGIA Y ENFERMEDADES INFECCIOSAS. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

Establecida en los epidídimos, *B.ovis* produce una reacción inflamatoria caracterizada por edema perivascular 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^(6, 8).

Las vesículas seminales y las ampollas parecen ser el asiento más común de la infección por *B.ovis*^(6, 37, 7). Esto explicaría la presencia de carneros positivos a la serología de *B.ovis*, pero sin lesiones palpables en el aparato reproductor^(20, 84).

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^(14, 99, 86, 7), sin embargo el semen es la vía más importante de excreción y transmisión de la enfermedad⁽⁴²⁾.

ASPECTOS CLINICOS - 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⁽¹⁷⁾.

La primera lesión palpable en los epidídimos aparece a los 45 días, tras la inoculación de *B.ovis* vía conjuntival⁽⁶⁾. Sin embargo, Bulgin (1990b) describe que las lesiones aparecen ya a partir de la 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, 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^(98, 46, 20). Los carneros afectados mantienen una libido normal⁽²⁰⁾. 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^(17, 26, 21).

PATOLOGIA

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^(17, 26, 21). La respuesta del animal es variada y puede estar dirigida contra antígenos de los espermatozoides, fluido seminal, la *Bruceella zymoides* o una combinación de estos⁽³⁷⁾.

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^(88, 17, 50, 74). La cola del epidídimo afectada está firme al tacto con un contorno irregular⁽⁵⁰⁾. Al cortar el órgano aparecen abscesos con un contenido cremoso o caseoso y es comprobable un aumento del tejido conectivo intersticial^(88, 17, 50).

Pueden advertirse adherencias entre el epidídimo con el testículo y la túnica vaginal^(88, 17, 50). 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⁽⁶⁾. 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^(50, 6, 74). La presencia de calcificaciones⁽¹⁷⁾ también han sido reportadas.

2.- 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^(88, 50, 74, 7, 60). Estos cambios son generalmente segmentales y

más severos en la parte distal del epidídimo⁽⁶⁾. 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⁽⁵⁰⁾. 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^(50, 7, 8).

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^(74, 37, 87) y procesos de fibrosis e hiperplasia epitelial con vesículas intra epiteliales, similares a lo observado en epidídimo⁽⁷⁾.

EPIDEMIOLOGIA

1.- 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 (Figura N° 1)^(24, 34). Si bien hay algunos países que han controlado y erradicado la enfermedad, de muchos otros no hay información disponible⁽³⁴⁾.

Cuando la enfermedad es reportada por primera vez en un país o región la incidencia suele ser alta con un 20% a un 60% de los carneros infectados y un 45 a 70% de las majadas infectadas^(8, 21). En países donde la enfermedad es endémica la incidencia tiende a ser menor^(102, 71, 83). La prevalencia y distribución de la enfermedad varía también a veces en gran medida entre regiones y aún entre establecimientos^(72, 94, 43, 82, 83). En Argentina, si bien nunca se ha hecho un relevamiento nacional, se sabe que en la Región Mesopotámica las prevalencias a nivel departamental varían entre un 11% y un 21%⁽³³⁾, mientras que en la Patagonia las prevalencias varían de un 4% a 10% en Río Negro, Neuquén y Chubut y de un 8% a 20% en Santa Cruz y Tierra del Fuego^(83, Robles, datos inéditos).

MICROBIOLOGIA Y ENFERMEDADES INFECCIOSAS. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

No se han encontrado diferencias en la incidencia de epididimitis entre varias razas como la Suffolk, Hampshire, Merino, Karakul, Persas y Doper^(62, 94). 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⁽²²⁾. Sin embargo en carneros naturalmente infectados el cuadro es diferente ya que *B.ovis* se aísla comúnmente de carneros adultos con experiencia sexual previa^(72, 19) y muy raramente en animales jóvenes⁽⁶⁴⁾. 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⁽⁸⁴⁾.

En opinión de varios autores las hembras son más resistentes a la enfermedad que los machos^(15, 42, 51, 11). Esto ha sido demostrado en varios estudios donde la prevalencia de la infección por *B.ovis* fue entre 2 y 10 veces mayor en machos que en hembras^(41, 33) y son pocos los casos reportados en que se ha constatado la infección en hembras^(42, 63, 57). Finalmente, de acuerdo a Hartley y col. (1955) las hembras se infectan y desarrollan la enfermedad solo cuando están preñadas y son incapaces de mantener la infección

de una estación reproductiva a la otra.

2.- Transmisión natural

La infección natural por *B.ovis* ocurre solamente en el ovino y no constituye una zoonosis⁽⁵³⁾. 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⁽¹⁵⁾ y de un carnero sano luego de mantener un contacto sexual con una oveja sana que había sido montada previamente por un carnero infectado^(15, 42, 12).

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^(15, 42). Hartley y col. (1955) y 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^(15, 42) y la actividad homosexual de los carneros fuera de la época de servicio sería la segunda forma mas importante de transmisión de la enfermedad^(15, 42).

3.- Infección artificial de ovinos con *B.ovis*

Experimentalmente, *B.ovis* ha sido transmitida por inoculación endovenosa^(14,48,12, 63, 11); inoculación intratesticular e intraepididimal^(14,88,48,50,11) y subcutáneamente⁽¹¹⁾.

La instilación de semen infectado y/o cultivos de la bacteria también han sido usados para reproducir la enfermedad. Esto incluye la mucosa bucal^(15,63,11); la conjuntiva^(12, 11); la mucosa nasal^(74,11); mucosa prepucial^(14,88, 48,99,74,11), Proceso uretral y pene⁽⁵⁴⁾ y la mucosa rectal⁽⁷⁴⁾.

Según Marin y col (1990) los mejores resultados en estudios de reproducción experimental de la infección se obtienen usando las vías conjuntival y prepucial simultáneamente. Usando dosis de 10^8 y 10^9 microorganismos los autores lograron el 100% de infectividad en carneros.

4.- Transmisión a otras especies

Se ha logrado transmitir experimentalmente la infección a bovinos⁽¹⁴⁾, a caprinos⁽²⁵⁾, a cobayos^(14, 88, 50), a conejos y a ratones⁽¹⁴⁾ y a ratas⁽⁵⁰⁾ pero no se han reportado casos de infección natural en estas especies.

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^(99, 9, 69). Sin embargo hay una diversidad de opiniones entre diferentes autores respecto a la performance de estas técnicas.

1.- Revisación clínica

La palpación de los órganos genitales externos, permite el diagnóstico de la epididimitis, que es una de las manifestaciones clínicas frecuentes de la infección^(95, 80). Si bien la técnica es barata y fácil de llevar a cabo, los resultados no son concluyentes ya que (a) hay otros organismos como *Actinobacillus seminis*, *Histophilus ovis*, *Corynebacterium spp*, *Escherichia coli*, *Pasteurella spp*, etc., que producen epididimitis palpables^(47, 96, 27, 56, 81); (b) no todos los carneros infectados desarrollan epididimitis^(67, 21, 49, 52, 84) y (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⁽⁹⁹⁾. 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 adquiridas en el tracto genital.

2.- Detección del agente

2.1.- Tinciones

Improntas de semen o tejidos pueden ser teñidas con Gram, pero la técnica más específica es la coloración de Ziehl-Neelsen modificada⁽⁹⁰⁾ en la cual *B.ovis* aparece como un pequeño cocobacilo teñido de rojo^(14, 4). 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^(90, 56, 4, 9) y además hay que recordar que

MICROBIOLOGIA Y ENFERMEDADES INFECCIOSAS. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

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^(99, 23). 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.

2.2.- 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⁽⁹⁹⁾. Para el cultivo de muestras de campo el medio selectivo de Thayer-Martin^(104, 4, 9) y el medio de Skirrow modificado⁽⁹⁷⁾ son los más recomendados para el aislamiento de *B.ovis*.

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.

2.3.- 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^(3, 38).

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.

2.4.- Sondas moleculares de DNA y Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Hopper y col (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 y col. 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.melitensis*, *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 y col. (1995) hallaron resultados similares con una PCR, que detectó las 6 especies de brucellas y todas sus biovariedades.

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.melitensis* y *B.ovis*, se pueden crear situaciones confusas.

3.- Detección de anticuerpos séricos

En contraste con *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* 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^(4, 65).

Para la realización de todos los tests serológicos el extracto salino en caliente que contiene proteína y también lipopolisacárido rugoso⁽⁷⁶⁾ es el antígeno más recomendado^(4, 8).

3.1.- Prueba de la Fijación del complemento (FC)

La FC es la prueba más utilizada para el diagnóstico serológico de la infección por *B.ovis*^(70, 8). Ha sido usada con éxito junto con otros procedimientos en programas de control para eliminar la brucelosis ovina a nivel de establecimiento^(100, 70), 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 hemolizados, 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^(44, 45, 23, 97, 104, 52, 58, 8).

3.2.- 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⁽⁵⁸⁾.

Los geles pueden prepararse con diferentes agares, agarosas y bufferes^(5, 103, 10) pero los geles hipertónicos (10% de ClNa) son altamente recomendables^(32, 58, 8). 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⁽⁵⁸⁾.

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 Diaz (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.

3.3.- 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 más sensible cuando se lo compara con la FC y la DDG^(75, 103, 1, 104, 58) sino que tiene una serie

MICROBIOLOGIA Y ENFERMEDADES INFECCIOSAS. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

de ventajas cuales son (a) no es necesario inactivar los sueros como para la FC^(103, 79, 55, 58); (b) no tiene problemas con sueros hemolizados o anticomplementarios^(75, 89, 58); (c) trabaja con una sola dilución del suero^(103, 79, 58); (d) requiere una mínima cantidad de antígeno, que en general es un tema crítico y (e) los reactivos son en general más estables que aquellos que utiliza la FC^(75, 58). Finalmente, el test de ELISA es capaz de detectar cualquier tipo de inmunoglobulina dependiendo del conjugado que se use y puede ser totalmente automatizado.

3.4.- Otros tests

Una prueba de hemaglutinación indirecta^(77, 78, 99) y una prueba de inmunofluorescencia indirecta⁽³⁰⁾ 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.

CONTROL

1.- 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 oxiciclina 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^(59, 31).

2.- Diagnóstico y sacrificio

La infección por *B.ovis* puede ser erradicada por el sistema de diagnóstico y sacrificio de los positivos⁽⁶⁹⁾. Esta metodología es recomendable fundamentalmente cuando la prevalencia de la enfermedad es baja^(13, 69).

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^(23, 75, 103, 1).

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).

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^(20, 101).

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^(69, 101, 82).

3.- Vacunación

La vacunación es el método más económico y práctico para controlar la infección por *B.ovis* en áreas con prevalencias altas y medias⁽⁸⁾. 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. 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.

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, acarreado confusión en el diagnóstico serológico de la enfermedad^(39, 29, 7) o la imposibilidad de recomendar el uso de la REV I en áreas libres de *B.melitensis*⁽²⁹⁾. Sin embargo esto no sería tan así a partir de que Blasco y col. (1987) y Fensterbank y col. (1982) demostraron que la cepa vacunal de *B.melitensis* 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 y col. (1990) con la vacuna REV I, demostraron que los títulos vacunales caían dramáticamente vacunando carneritos jóvenes usando la vía conjuntival.

REFERENCIAS

1. AFZAL, M.; TENDERDY, 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.

MICROBIOLOGIA Y ENFERMEDADES INFECCIOSAS. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

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 melitensis* REV 1 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.; JIMEMEZ DE BAGUES, M.P. (1990) Brucellosis ovina: Diagnóstico serológico. Ovis, **8** :51-64.
11. BLASCO, J.M. Y BARBERAN, M. (1990) Brucellosis ovina: Epidemiología, patogenia 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. BUCKRELL, 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 NORRIS, 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.
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

MICROBIOLOGIA Y ENFERMEDADES INFECCIOSAS. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

- 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. Nº 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 melitensis* 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 melitensis* 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 aetiology 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. LAWRENCE, 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*

MICROBIOLOGIA Y ENFERMEDADES INFECCIOSAS. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

- 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 1 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. MORIYON, I. y GAMAZO, C. (1990) Estructura antigenica de Brucella melitensis y Brucella ovis. Ovis, **8** :35-49.
66. MYERS, D.M. & SINIUUK, 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. NIILLO, L. (1984) Diagnosis of Ovine Brucellosis. Canadian Veterinary Journal, **25** :118-119.
71. NIILLO, 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) Brucellosis 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-lipopolisaccharide 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 tecnica. Ed. INTA Bariloche, Argentina. pp: 12.
81. ROBLES, C.A.; URCULLU, J.A.; UZAL, F.A. (1990) Primer diagnóstico en Patagonia de orquioepididimitis 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).- Brucellosis 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.

MICROBIOLOGIA Y ENFERMEDADES INFECCIOSAS. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

- 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.; MULDER, 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.