

"AISLAMIENTO DE *Brucella ovis* DEL TRACTO GENITAL Y LECHE DE OVEJAS CON PERSISTENCIA DE TITULOS POSITIVOS A ELISA"

Paolicchi¹, F.; Silva Paulo², P.; Solanet¹, C.; Eberhardt³, A.; Malena¹, R.;

Fiorentino^{1,4}, M.A.; Vigliocco, A.²

1. Grupo de Sanidad Animal, Unidad Integrada EEA INTA – Facultad Ciencias Agrarias UNMdP. 2. CNEA, Ezeiza, Argentina. 3. Actividad Privada. 4. CONICET.

RESUMEN

La brucelosis ovina a *Brucella ovis* es una enfermedad de alta prevalencia en Argentina. Es conocido su papel en la patogenia de la epididimitis del carnero, pero es escasa la información del rol que cumple en la oveja. Con el objetivo de estudiar la persistencia de *B. ovis* en ovejas, se realizó un seguimiento durante 3 años en un establecimiento de 900 ovejas de las razas Corriedale y Texell, con antecedentes de epididimitis, serología ELISA positiva y aislamiento de *B. ovis* del semen de los carneros. Se seleccionaron 56 ovejas adultas, 26 con títulos a ELISA positivos (**Grupo A**) y 30 con títulos a ELISA negativos (**Grupo B**) las cuales recibieron servicio durante 60 días con 2 carneros Merino negativos a *B. ovis* en cada grupo. Transcurrido el servicio, las 56 ovejas fueron agrupadas en un lote y los machos separados de las hembras. Todos los animales fueron sangrados para estudiar la evolución de los títulos por ELISA durante 330 días. Se extrajo semen y mucus cervico-vaginal en 4 oportunidades para identificar *B. ovis* por cultivo. Se evaluaron los índices reproductivos de las ovejas. Al finalizar el estudio se realizó la necropsia a los carneros, a 4 hembras del GA y 4 hembras del GB y a 2 corderos de

cada grupo para estudios bacteriológicos, patológicos e histológicos. Los carneros no manifestaron alteraciones clínicas ni lesiones genitales en la necropsia, resultaron ELISA negativo mientras que el semen y los tejidos genitales fueron negativos a **B. ovis**. El 100% de las hembras del GA permanecieron positivas al ELISA durante los 330 días del ensayo. Las hembras del GB permanecieron negativas al ELISA durante el ensayo, excepto 2 ovejas que aparecieron positivas al ELISA durante el mismo. Los índices reproductivos fueron: destete de corderos para GA 84,6% (n=22) y GB 93,4% (n=28), ovejas con pérdida de corderos: Para GA 31% y GB 16%. Se aisló **B. ovis** de la leche de una oveja y de genitales de otra hembra, ambas de GA con ELISA positivo, pero no hubo aislamientos en ovejas del GB. Del total de los corderos nacidos del GA, 5 resultaron ELISA positivo, 2 de ellos nacidos de hembras con aislamiento de **B. ovis** en tracto genital y leche. Los corderos nacidos del GB permanecieron negativos al ELISA, excepto uno que resulto positivo a ELISA y fue nacido de una oveja positiva al ELISA durante el ensayo. Estos resultados indican la posibilidad de la persistencia de la infección con **B. ovis** en ovejas por al menos 330 días. En las majadas positivas a Brucelosis las hembras podrían ser las responsables de mantener la infección en forma pasiva, contribuyendo a desmejorar los índices reproductivos.

Palabras Clave: *Brucella ovis*, *Epididimitis de los Carneros*, *ELISA*, *Ovejas*.

1-Médicos Veterinarios, Técnicos EEA INTA Balcarce. CC 276, (7620) Balcarce, Argentina.

2-Técnicos Comisión Nacional de Energía Atómica Ezeiza, Argentina. 3-Laboratorio Análisis Clínicos Veterinarios Fares Taie, Argentina.

Correspondence author: F.Paolicchi, E-mail: fpaolicchi@balcarce.inta.gov.ar

SUMMARY

Ovine brucellosis caused by *Brucella ovis* is a high prevalence illness in Argentina. Its role is well known in rams epididymitis pathogeny though there is very scarce information about its role in sheep. With the aim of studying *B. ovis* persistence in sheep a follow up was carried out during a three years period, in a 900 Corriedale and Texell sheep stable having epididymitis records, ELISA positive, and *B. ovis* isolation from ram semen. A total of 56 adult sheep were selected, 26 with ELISA positive (Group A) and 30 with ELISA negative (Group B) being bred for 60 days period, with two negative *B. ovis* Merino rams in each group. After breeding period, 56 sheep were gathered in share and males taken apart. All animals were bled to study ELISA titles evolution during 330 days period. Vaginal mucus and semen were extracted at four times to identify *B. ovis* by culture. Reproductive index in sheep were evaluated. At study's conclusion, the rams necropsy was performed, as well as GA to 4 sheep, and GB to other 4 sheep, while bacteriological, pathogenic and histological studies were performed to 2 lambs of each group. These lambs did not show clinical changes or genital lesions at necropsy, resulting ELISA negative while semen and genital tissue were *B. ovis* negative. The 100% of GA females remained ELISA positive during the 330 days test. The GB females remained ELISA negative during the test except for two sheep been ELISA positive during same period. The reproductive index were: lamb weaning for GA 84,6% (n=22) and GB 93,4% (n=28), sheep with lamb losses: for GA 31% and GB 16% *B. ovis* was isolated from milk of a sheep, as well as another female genitals, both GA with ELISA positive, although no isolation was done on GB sheep. The total lambs born from GA, 5 resulted ELISA positive, 2 of which were born from females *B. ovis* isolated in genital tract and milk. The lamb born from GB remained ELISA negative, excepting one which resulted ELISA positive born from a sheep which was ELISA positive during test. These results show a chance of *B. ovis* infection in sheep for at least 330 days. In brucellosis positive sheepfolds females could be responsible of keeping a passive way of infection, contributing to worsen reproductive index.

Key words: *Brucella ovis*, Rams Epididymitis, ELISA, Sheep.

INTRODUCCIÓN

La brucelosis ovina cuyo agente etiológico es *Brucella ovis* (*B. ovis*), es altamente prevalente en Argentina principalmente en las áreas de mayor difusión de cría de ovinos. La infección en ovinos se caracteriza principalmente por inducir en los carneros lesiones genitales y disminución de la fertilidad asociada a inmunidad antiespermática (Blasco, 1990; Paolicchi, et al 2000).

La transmisión de la infección se produce de manera venérea a través de la oveja durante la estación reproductiva, o a través de las mucosas entre carneros cuando existe sodomía u olfateo prepuccial (Buddle, 1955). Además se ha sugerido que la vía congénita sería una ruta factible de infección con *B. ovis* (Burgués, 1982; Bulgin, 1990). La infección en la oveja produce endometritis, placentitis y abortos durante el último tercio de la gestación tanto en infecciones naturales (Libal and Kirkbride, 1983) como experimentales (Hartley et al, 1954; McGowan et al, 1961; Collier and Molello, 1964). Usualmente, ovejas infectadas con *B. ovis* pueden parir a término corderos muertos o débiles que mueren dentro de los pocos días posteriores al parto (Libal, 1990) ocasionando una disminución en los porcentajes de preñez y parición del orden del 15% al 20 % en majadas infectadas (Homse y cols, 1994).

En Argentina *B. ovis* fue inicialmente diagnosticada en el año 1961 por Szyfres y Chappel y posteriores estudios de Ostrowski y cols. (1963) hallaron un 37% de carneros con lesiones epididimarias y seropositivos a Fijación del Complemento (Fc) en la provincia de Buenos Aires. Por otro lado, en la provincia de Corrientes se detectaron prevalencias que fluctuaron entre 6,1 % y 16,2% en carneros y 9,3% en ovejas (Draghi de Benítez y cols., 1984; Draghi de Benítez y cols., 1989).

Paolicchi y cols. (1991a) aislaron *B. ovis* del semen de carneros sin lesiones genitales, en Provincia de Buenos Aires en majadas que presentaron antecedentes de problemas reproductivos. En nuestro laboratorio entre 1998 y 2002 se analizaron 2652 sueros para diagnóstico de *B. ovis* por ELISA indirecto. Los mismos pertenecían a 11 cabañas y a 25

majadas de 15 partidos de la provincia de Buenos Aires y uno de Santa Fe. Un 12,9 % de las muestras resultó positiva a ELISA, porcentaje 3 veces mayor en machos que en hembras de diferentes razas ovinas remitidas. En cabañas el porcentaje de reactores fue 6 veces menor que en majadas generales y el 75 % de los establecimientos fueron positivos. Si bien estas muestras no indicaron prevalencia se determinó que la brucelosis por *B. ovis* fue de amplia distribución principalmente en Buenos Aires.

Actualmente no existe un programa nacional para el control de esta enfermedad y son limitados los Laboratorios de Diagnóstico Veterinario que ofrecen el servicio de diagnóstico serológico con técnicas de alta sensibilidad y especificidad como ELISA o Fijación del Complemento (ambas validas para OIE). Por otro lado, durante mucho tiempo se ha considerado a las ovejas poco importantes en la epidemiología de la infección por *B. ovis* en las majadas.

El objetivo del presente trabajo fue determinar el rol de las hembras infectadas con *B. ovis* en la persistencia de la enfermedad en una majada con antecedentes serológicos y bacteriológicos de infección en carneros.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales: Fueron utilizados ovinos pertenecientes a un establecimiento ubicado en la provincia de Buenos Aires, Argentina, con un total de 900 ovejas de las razas Corriedale y Texell. En el mismo, fueron registrados antecedentes de la enfermedad en los carneros con epididimitis, alto porcentaje de seroreactores a ELISA (31,7%) y aislamiento de *B. ovis* de semen en forma recurrente (Paolicchi y cols, 1999). Durante los 3 años previos, los carneros del establecimiento estuvieron sujetos a un control serológico preservicio y postservicio cada 60 días durante el resto del año, con eliminación a faena de todos los seroreactores.

Selección de animales: Para conformar los lotes del ensayo, se seleccionaron un total de 56 ovejas adultas con un peso promedio de $45,2 \pm 6$ Kg., condición corporal similar y todas con registros de parición en el año anterior. Los animales fueron separados en dos grupos, el primero con 26 ovejas con serología positiva a ELISA (**Grupo A**) y el segundo con 30 ovejas con serología negativa a ELISA (**Grupo B**). Las ovejas fueron mantenidas en condiciones naturales sobre pasturas consociadas de *Rye Grass* perenne y *Melilotus* spp con una carga de 4 animales por hectárea. Durante el servicio de otoño por el termino de 45 días, se asignaron dos carneros adultos Merino por grupo, provenientes de un establecimiento libre de la enfermedad, con serología negativa a ELISA y condiciones clínico-reproductivas normales. Finalizado el servicio, la totalidad de las ovejas fueron agrupadas en un solo lote y los 4 machos separados de las hembras.

Análisis serológicos: Ovejas y carneros fueron sangrados por punción yugular una semana antes del servicio y posteriormente cada 30 días hasta los 330 días para estudiar la evolución de los títulos serológicos. Los corderos fueron sangrados cada 30 días a partir del mes de nacimiento hasta el destete (6 meses). Con los sueros se realizó un ELISA indirecto para *B. ovis* descrito y validado para ovinos por Vigliocco y cols (1997), que utiliza un antígeno rugoso purificado (SRA-pp) obtenido de *B. ovis* Cepa Nro 11 (Myers et al, 1972; Suarez et al, 1988). La sensibilidad y especificidad del ELISA utilizado fue de 96,43% y de 100%, respectivamente y el valor del *cut-off* de 0.095 DO. Los sueros también fueron sometidos a la prueba tamiz de antígeno bufferado en placa (BPA) según indica la técnica estándar para el control de brucelosis bovina en Argentina (González Tome y cols, 1989), con el objetivo de descartar cualquier infección simultánea con cepas lisas del género *Brucella* (*B.abortus* o *B.melitensis*).

Estudios bacteriológicos: Se extrajeron en recipientes estériles muestras de:

a) **Carneros:** semen con electroeyaculador (Delver EED 1005, Argentina) en 4 oportunidades y cada 30 días luego de 2 meses postservicio para evaluar la presencia de *B. ovis* por cultivo. Adicionalmente, en el momento de la necropsia se obtuvieron muestras de: testículos, epidídimos, vesículas seminales y ampollas de los conductos deferentes, glándulas bulbouretrales, próstata, linfonódulos regionales inguinales y bazo.

b) **Ovejas:** mucus cérvico-vaginal con pipeta plástica estéril inmediatamente luego del servicio y en 3 oportunidades durante el ensayo, mientras que en la necropsia se tomaron muestras de cuernos uterinos, cérvix, oviductos, ovarios, linfonódulos regionales inguinales y mamarios.

Todas las muestras obtenidas fueron cultivadas inmediatamente en nuestro Laboratorio.

Procedimiento de Laboratorio: El material fue sembrado sin tratamiento previo sobre placas de agar sangre Columbia y agar Skirrow (Paolicchi et al, 2000), las cuales fueron incubadas a 37°C en atmósfera con 10% de CO₂ y observadas cada 48 hs durante 10 días por el desarrollo de colonias sospechosas. *B. ovis* fue identificada por: morfología de las colonias y microscópica mediante frotis y coloración de Gram y Ziehl Neelsen modificado (ZN). Las colonias sospechosas fueron clonadas en agar Sangre Columbia, caracterizadas y tipificadas por pruebas bioquímicas estándar como actividad de las enzimas ureasa y oxidasa, producción de SH₂, requerimientos para el desarrollo en atmósferas con CO₂, crecimiento en distintas concentraciones de tionina o fucsina y sensibilidad al fago R/C según técnicas estándar internacionales para identificación del genero *Brucella* (Corbeil and McHendry, 1985). Con el semen se efectuaron frotis en portaobjetos y fueron coloreados con la técnica de ZN para identificación de cocobacilos similares a *Brucella spp* y también para identificación de células inflamatorias. Adicionalmente, se investigó la presencia de otros agentes bacterianos patógenos que producen infertilidad, abortos en ovejas y/o epididimitis en carneros, como es el caso de

Campylobacter fetus, *Haemophilus ovis*, *Actinobacillus seminis*, *Corynebacterium ovis* e *Histophilus ovis*. Para ello, sobre los mismos medios de cultivo se identificaron y clonaron posibles colonias con características similares a los géneros descritos y se realizaron pruebas bioquímicas a fin de identificarlas con exactitud.

Estudios patológicos: A los 330 días del inicio del ensayo fueron sometidos a necropsia los 4 carneros, 4 hembras y 2 corderos de cada grupo (GA y GB), animales seleccionados de acuerdo a los resultados serológicos por ELISA obtenidos al final del ensayo. De los machos se obtuvieron porciones de: testículos, epidídimos, vesículas seminales y ampollas de los conductos deferentes, glándulas bulbouretrales y próstata. Además se extrajeron los linfonódulos regionales y el bazo. De las hembras fueron obtenidas porciones de: cuernos uterinos, cérvix, oviductos y ovarios, como también los linfonódulos regionales y los mamaros. Los tejidos fueron sometidos a cortes de 5 micras y coloreados con hematoxilina eosina y observados al microscopio.

Índices reproductivos: Durante la temporada de partos se registraron los índices reproductivos: a) porcentaje de parición, b) de destete y c) de mortandad perinatal y conjuntamente se examinaron el desarrollo de la ubre de las ovejas y cualquier indicio de aborto. Posteriormente y de acuerdo a estos índices las ovejas fueron clasificadas en tres categorías: **1:** hembras con cría al pie en lactancia, **2:** hembras sin cría al pie con desarrollo de ubres y secreción y, **3:** hembras sin cría al pie y sin desarrollo de ubres.

RESULTADOS

Clínico genitales: Los 4 carneros utilizados para el servicio no manifestaron alteraciones clínicas ni evidencia macroscópica de patología en sus genitales al finalizar el servicio. No se observaron abortos, placentas retenidas o nacimiento de corderos muertos a término.

Serológicos: Los carneros permanecieron seronegativos al ELISA durante el transcurso del ensayo. Las hembras del GA permanecieron seropositivas al ELISA con una DO promedio de 0.320 (\pm 0.045) durante todo el ensayo. De las hembras del GB, dos seroconvirtieron a los 60 días de finalizada la parición y fueron identificadas como categoría 2, el resto permanecieron seronegativas durante el ensayo con una DO promedio de 0.045 (\pm 0.010). De los corderos nacidos en el GA, 5 fueron positivos a ELISA con una DO promedio de 0.312 (\pm 0.024) durante cuatro muestreos consecutivos hasta el destete, dos de estos nacidos de hembras con aislamiento de *B. ovis*. Los corderos nacidos del GB permanecieron negativos al ELISA hasta el destete, excepto uno seroreactor nacido de una hembra del grupo de las negativas convertida en seroreactora a partir de los 60 días pos parto.

Bacteriológicos: El cultivo de semen y de tejidos genitales de los carneros resultaron negativos al cultivo de *B. ovis*. No se observó desarrollo de colonias de otros patógenos bacterianos productores de epididimitis o abortos. *Brucella ovis* fue aislada en pureza desde de los cuernos uterinos, linfonódulos mamarios y la leche de 2/4 ovejas (Nro 559 y Nro 548) del GA necropsiadas, pero no hubo aislamiento de los 2 corderos nacidos de estas madres. No se registró ningún aislamiento en las muestras de leche u órganos tomadas de las ovejas del GB, ni de los corderos del mismo grupo.

Patológicos: Los carneros y corderos de ambos grupos mostraron histología normal en los tejidos analizados. Las ovejas Nro 559 y Nro 548 mostraron signos inflamatorios moderados en cortes de linfonódulos mamarios y en útero y cérvix, con un componente celular linfoplasmocítico principal y leves signos de cronicidad del proceso inflamatorio.

Índices reproductivos: El porcentaje de ovejas sin cría al pie (categoría 2 y 3) fue del 31% en el GA versus el 16% en el GB, mientras que el porcentaje de destete fue del 84,6% para el GA versus el 93,4% para el GB, registrando levemente a favor el número de nacimientos de mellizos en el GB.

DISCUSIÓN

Los resultados presentados aquí confirman la persistencia de la infección de *B. ovis* y en consecuencia la importancia epidemiológica de las ovejas infectadas, cumpliendo un rol respecto a la permanencia de la infección en majadas con antecedentes reproductivos bajos y con carneros seropositivos durante años consecutivos. Estos hallazgos son coincidentes con los de otros trabajos de investigación sobre brucelosis ovina donde se describe la permanencia de ovejas positivas en majadas sometidas a control serológico de los carneros durante más de 2 años (Marco et al, 1994).

La persistencia de la infección con *B. ovis* en las majadas de Argentina podría estar ocasionada por la permanencia de carneros infectados sin lesiones clínicas de la enfermedad y seronegativos a ELISA, pero que excretan *B. ovis* en el semen. Este hecho es un hallazgo de relativa frecuencia en casos de epididimitis en carneros, (Burgess, 1982; Paolicchi y cols, 1999).

En este ensayo no se pudo confirmar la transmisión venérea de la infección desde las ovejas, ya que los carneros permanecieron seronegativos y no fue aislada *B. ovis* del semen o de los tejidos genitales de los mismos. A pesar de que el cultivo es el diagnóstico de certeza para los casos de brucelosis, la utilización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) podría ser de utilidad para aplicarse en muestras de semen e identificar bajas concentraciones de *B. ovis* de difícil detección en medios de cultivo (Manterola, 2003).

Los carneros excretores de *B. ovis* pueden constituirse en una fuente de infección para las ovejas durante la temporada de servicio, pero también para otros carneros vírgenes

no infectados, que al ingresar por primera vez a la majada en la etapa reproductiva podrían ser contagiados por sodomía o transmisión venérea pasiva (Bulgin, 1990).

La aparición de nuevos carneros seropositivos al ELISA de un año a otro, a pesar de la previa eliminación de los seroreactores, es un indicio de que la persistencia de la infección podría ser responsabilidad de ovejas infectadas persistentemente, como se ha demostrado en infecciones con *B. melitensis* (Chand et al, 2005).

Se ha considerado que las ovejas pierden sus títulos serológicos a brucelosis transcurrido un año y que sería excepcional que los anticuerpos se perpetúen más de dos años (Hughes, 1972; Ris, 1970). Sin embargo, la latencia de la infección con *Brucella* ha sido demostrada en bovinos infectados con *B. abortus* y en ovejas infectadas con *B. melitensis*. En estos casos el ELISA en leche ha sido aplicado en majadas infectadas con *B. melitensis* constituyendo una alternativa para el diagnóstico de brucelosis en ovejas lactando. López y cols (2006) recomendaron el uso del ELISA-*B canis* para el estudio de ovejas seroreactoras en leche debido a la alta sensibilidad y especificidad determinadas en la técnica.

La inoculación intracervical con *B. ovis* en ovejas inseminadas ha demostrado que la persistencia de la infección se extiende al menos hasta los 45 días posinoculación (PI), produciendo lesiones como endometritis, salpingitis y cervico vaginitis purulenta (Homse y cols, 1994). En estos ensayos, la seropositividad de los animales se ha mantenido al menos hasta los 120 días PI con títulos de FC entre 1/40 y 1/10. A pesar de que la persistencia en los títulos serológicos anti *B.ovis* en las ovejas no asegura que la infección afecte su estatus reproductivo, la bacteria se acantonaría por períodos prolongados en linfonódulos regionales del tracto genital, glándula mamaria y bazo. Esta infección latente podría provocar una importante disminución en los índices de preñez, parición y señalada, con diferencias de hasta 18.6%, 21.3% y 17,4% respectivamente, comparados con los índices reproductivos obtenidos en ovejas no infectadas (Homse y cols, 1994). En ovejas infectadas experimentalmente con *B.*

melitensis biovar 3 y monitoreadas durante 3 ciclos reproductivos, la infección se confirmó por la presencia de descargas vaginales, aislamiento en leche y en órganos reproductivos (Titarelli et al, 2005). El rol que cumplen las ovejas infectadas por *B. ovis* y con persistencia de títulos serológicos ha sido descrito por otros autores hallando evidencias serológicas y bacteriológicas de la infección persistente en el 22,5% de las ovejas estudiadas provenientes de majadas problema (Marco et al, 1994).

En nuestro trabajo, adicionalmente se investigó la presencia de otros agentes patógenos bacterianos que producen infertilidad, abortos en ovejas y/o epididimitis en carneros, pero en todos los casos las muestras resultaron negativas. No fue identificada la presencia serológica de *Chlamydophila abortus* o de *Toxoplasma gondii*. Los resultados bacteriológicos de nuestro trabajo son similares con los de otros autores (Marco et al, 1994), ya que el aislamiento de *B. ovis* pudo lograrse desde muestras de útero, de linfonódulos mamarios y de la leche de las dos ovejas sometidas a necropsia. Estos aislamientos obtenidos en nuestro ensayo a partir de los órganos y de la leche de las ovejas seroreactoras al ELISA, son considerados evidencia importante de la presencia de la enfermedad en la majada después de 330 días de seguimiento. Trabajos experimentales de inoculación con *B. ovis* en ovejas preñadas, demostraron que la excreción de la bacteria se produce fundamentalmente durante la lactación y un número reducido de ovejas excreta *B. ovis* durante la preñez (Grillo et al, 1999). Estos autores, no pudieron demostrar que los corderos estuviesen infectados, a pesar de que algunas ovejas tuvieron persistencia de la infección con excreción de *B. ovis* en la leche durante la segunda temporada de lactancia.

En el tracto genital de la oveja, *B. ovis* provoca daños histológicos e inflamatorios como cervicitis y endometritis muco-purulenta que conducen a la muerte del embrión, abortos o nacimiento de corderos con infección latente por pasaje transplacentario (Marco et al, 1994). En nuestro trabajo, la presencia de corderos seropositivos al ELISA pudo deberse al resultado de una infección congénita, pero no debería ser descartada la

posibilidad de que la seroreactividad observada en los mismos sea por absorción pasiva de anticuerpos presentes en la leche de las ovejas infectadas. El nacimiento de corderos infectados podría representar una vía más para mantener la enfermedad en la majada cuando el fenómeno de infección latente con *B. ovis* en ovejas esta presente.

Con estos resultados concluimos que es factible la existencia de ovejas persistentemente infectadas con *B. ovis* y que estas jugarían un rol de importancia en la epidemiología de la enfermedad en la majada. Su presencia y permanencia puede ocasionar el fracaso de la aplicación de un programa sanitario de control y erradicación de la enfermedad, si en estos programas solo se considera que los machos son los únicos animales susceptibles de contraer y mantener la infección en la majada.

AGRADECIMIENTOS

A la Srta Romina Ramondino (CNEA) por la inestimable colaboración en el procesamiento del material bacteriológico y serológico. Al Sr. José Llamas (INTA Balcarce) por la colaboración permanente en las tareas de campo. Al Dr. Carlos Campero (INTA) por la lectura critica del manuscrito. Al Dr. Klaus Nielsen (ADRI, Canadá) por la provisión del anticuerpo monoclonal para realizar el ELISA. MAF es becaria Doctoral del CONICET.

BIBLIOGRAFÍA.

- 1 Blasco, J.** 1990. Brucelosis ovina. *Ovis*. 8: 1 69.
- 2 Buddle, M.** 1955. Observation on the trasmission of *Brucella* infection in sheep. *New Zealand Vet. J.* 3: 10 19.
- 3 Bulgin, M.** 1990. Epididymitis in rams and lambs. *Vet. Clin. North Am. Food An. Practice.* 6 (3): 683 690.
- 4 Burgess, G.** 1982. Ovine contagious epididymitis: a review. *Vet. Microbiol.* 7: 551 575.

- 5 Chand, P., Rajpurohit, B., Malhora, A., Poonia, J.** 2005. Comparison of milk ELISA and serum ELISA for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. *Vet. Microbiol.* 108 (3-4): 305 311.
- 6 Collier, J., Molello, J.** 1964. Comparative distribution of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella ovis* in experimentally infected pregnant sheep. *Am. J. Vet. Res.* 107: 930 934.
- 7 Corbel, M., McHendry, L.** 1985. Isolation and identification of microorganisms of medical a veterinary importance. p 53. Ed Academic Press, London. Vol 1.
- 8 Draghi de Benítez, G., Zurbriggen, M., Rochinotti, D., Vanzini, V., Homse, A., Baez Khon, A.** 1984. Brucelosis ovina: Estudio serológico en 6 departamentos de la provincia de Corrientes. *Vet. Arg.* 1: 39 43.
- 9 Draghi de Benitez, G., Soni, C., Rochinotti, D., Vanzini, V., Ramirez, L.** 1989. Brucelosis ovina: Estudios bacteriológicos y serológicos. Resumen anual INTA Mercedes, pp 23 25.
- 10 Estein, S., Cassataro, J., Vizcaino, N., Zygmunt, M., Cloeckert, A., Bowden, R.A.** 2003. The recombinant Omp31 from *Brucella melitensis* alone or associated with rough lipopolysaccharide induces protection against *Brucella ovis* infection in BALB/c mice. *Microbes Infect.* 5 (2): 85 93.
- 11 Estein, S., Cheves, P., Fiorentino, M., Cassataro, J., Paolicchi, F., Bowden, R..** 2004. Immunogenicity of recombinant Omp31 from *Brucella melitensis* in rams and serum bactericidal activity against *B. ovis*. *Vet. Microbiol.* 102: 203 213.
- 12 Gonzalez Tome, I., Villa, L., Del Palacio, E., Gregoret, R.** 1989. El test de Angus y Bacón (BPA) como prueba tamiz en el diagnóstico de la brucelosis bovina. *Rev. Med. Vet.* 70: 34 36.
- 13 Grillo, M., Marin, C., Barberan, M., Blasco, J.** 1999. Experimental *Brucella ovis* infection in pregnant ewes. *Vet. Rec.* 144 (20): 555 558.

- 14 Hartley, W., Jebson, J., McFarland, D.** 1954. The artificial infection of sheep with a brucella-like organism. The artificial infection of ewes. *New Zealand Vet. J.* 2: 80-85.
- 16 Homse, A., Casaro, A., Campero, C., Paolicchi, F., Terzolo, H.** 1994. Infección experimental en ovejas por *Brucella ovis*. *Rev. Med. Vet.* 75 (4): 302-306.
- 17 Hughes, K.** 1972. Experimental *Brucella ovis* infection in ewes: correlation of infection and complement fixation titres. *Australian Vet. J.* 48: 18-22.
- 18 Libal, M., Kirkbride, C.** 1983. *Brucella ovis* induce abortion in ewes. *J.A.M.V.A.* 183: 553-554.
- 19 Libal, M.** 1990. Laboratory Diagnosis of Livestock Abortion; Ovine abortion caused by *Brucella ovis*. Ed. Clyde Kirkbride, Third Edition, Iowa State University Press, Ames. Cap 7, 27-29.
- 20 Lopez, G., Escobar, G., Ayala, S., Lucero, N.** 2006. Detection of antibodies to *Brucella ovis* in sheep milk using *B. ovis* and *B. canis* antigen. *Vet. Microbiol.* 116 (1-3): 32-38.
- 21 Manterola, L., Tejero-Garcés, A., Ficapal, A., Shopayeva, G., Blasco, J.M., Marin, C.M., López-Goñi, I.** 2003. Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in semen samples from rams. *Vet. Microbiol.* 92: 65-72
- 22 Marco, J., González, L., Cuervo, L., Beltran de Heredia, F., Barberan, M., Marin, C., Blasco, J.** 1994. *Brucella ovis* infection in two flocks of sheep. *Vet. Rec.* 135: 254-256.
- 23 Myers, D., Jones, L., Varela Díaz, V.** 1972. Studies of antigen for complement fixation and gel diffusion test in the diagnosis of infections caused by *Brucella ovis* and others Brucella. *Appl. Microbiol.* 23: 894-902.
- 24 McGowan, B., Biberstein, E., Harrold, B., Robinson, E.** 1961. Epididymitis in rams: the effect of the ram epididymitis organism (REO) on the pregnant ewe. *Proc. U. S. Livest. Sanit. Assoc.* 65: 291-296.

- 25 Nielsen, K., Gall, D., Henning, D., Garcia, M.** 1992. Enzyme immunoassay: application to diagnosis of bovine brucellosis. Monograph, ADRI, Canada. pp 199-225.
- 26 Paolicchi, F., Cipolla, A., Vagnoni, L., Cobo, E., Vagnozzi, A., Ramondino, R., Silva Paulo, P., Vigliocco, A.** 1999. Aislamiento de *Brucella ovis* del semen de carneros seropositivos al test de ELISA y clínicamente sanos. Rev. Arg. Microbiol. 31 (1): 40-43.
- 27 Paolicchi, F., Casaro, A., Gimeno, E., Kortebani, G., Mazzoli, A.** 2000. Antisperm response in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. Small Rum. Res. 36: 7-15.
- 28 Ris, D.** 1970. The bacteriology and serology of ewes inoculated with viable *Brucella ovis* organism. New Zealand Vet. J. 18: 2-6.
- 29 Suarez, C., Pacheco, G., Vigliocco, A.** 1988. Characterization of *Brucella ovis* surface antigens. Vet. Microbiol. 18: 349-356.
- 30 Szyfres, B.; Chappel, J.** 1961. Comparación bacteriológica de la epididimitis infecciosa ovina en la Republica Argentina. Rev. Fac. Cs. Vet. La Plata. Año III 9: 405-409.
- 31 Titarelli, M., Di Ventura, M., De Massis, F., Ascachia, M., Giovannini, A., Nannini, D., Caporale, V.** 2005. The persistence of *Brucella melitensis* in experimentally infected ewes through three reproductive cycles. J. Vet. Med. Series B. 52 (9): 403-409.
- 32 Vigliocco, A., Silva Paulo, P., Mestre, J., Briones, G., Draghi, G., Tossi, M., Nielsen, K.** 1997. Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of ovine antibody to *Brucella ovis*. Vet. Microbiol. 54: 357-368.

Tabla 1. Porcentaje de animales seropositivos desde el comienzo del ensayo (día 0) y al final del mismo (día 330) y aislamiento de *B. ovis* en tracto reproductivo de ovejas ELISA positivas (GA) y ELISA negativas (GB), carneros y corderos nacidos durante el ensayo.

	Número de animales	% de seropositividad		Numero aislamientos <i>B.ovis</i>
		Día 0	Día 330	
Ovejas	GA (n=26)	100%	100%	2
	GB (n=30)	0%	6,6%	0
Carneros	4	0%	0%	0
Corderos	GA (n=22)	0%	22%	0
	GB (n=28)	0%	3,6%	0