

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA
DEPARTAMENTO DE CIENCIA ANIMAL



Estudio de Brucelosis causada por *Brucella ovis* en ovinos

TESIS DOCTORAL

Gustavo Aldo Lopez

Directora: Dr. Nidia Elena Lucero

Valencia, 2007

El presente trabajo de Tesis ha sido realizado en la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Lomas de Zamora y en el Laboratorio de Brucelosis del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas-Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud, “Dr. C.G. Malbran” (INEI-ANLIS). Argentina.

Esta tesis ha sido presentada como uno de los requisitos para optar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia.

El doctorando

Fdo. Gustavo Aldo Lopez

El director de tesis

Fdo. Nidia Elena Lucero

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a las personas e instituciones que contribuyeron con su aporte material y anímico a la finalización de esta Tesis.

A mi directora, Dra. Nidia Lucero.

A la Directora del INEI-ANLIS, Dra. María Inés De Mitri

Al personal del laboratorio de brucelosis del INEI-ANLIS, en especial a las Técnicas Químicas Sandra M. Ayala y Déborah B. Hasan y a la Bioq. Gabriela I. Escobar.

Al Dr. Fernando Paolicchi, Rosana Malena y Andrea Florentino, del laboratorio de Bacteriología del INTA-Balcarce-Bs.As., por su colaboración con muestras de ovinos.

A mis compañeros de facultad.

Al Dr. Manuel Láinez, quien gentilmente aceptó ser mi tutor en Valencia.

Al Dr. Salvador Vicente, por su invaluable colaboración.

A las autoridades de las Facultades de Cs. Agrarias e Ingeniería.

A las autoridades de la UPV.

Al Dr. Enrique Frank.

Especialmente a Patri, Agu, Pato, Mai y Sebi, por su paciencia y comprensión.

Y a todos aquéllos que de una u otra forma aportaron su granito de arena para que pudiera concluir éste trabajo.

Parte de los resultados de esta Tesis han sido publicados en los siguientes trabajos.

- **Lucero, N.E.; Escobar, G.I.; Ayala S.M.; Lopez, G.** 2002. Sensitivity and specificity of an indirect enzyme-linked immunoassay for the diagnosis of *Brucella canis* infection in dogs. J. Med. Microbiol. 51: 656-660.
- **Lopez, G., Ayala, S.M., Escobar, G.I., Lucero, N.E.** 2005. Use of brucella canis antigen for detection of ovine serum antibodies against *B. ovis*. Vet. Microbiol. 105: 181-187.
- **Lopez, G., Escobar, G.I., Ayala, S.M., Lucero, N.E.** 2006. Detection of antibodies to *Brucella ovis* in sheep milk using *B. ovis* and *B. canis* antigen. Vet. Microbiol. 116(1-3):232-238.

GLOSARIO

- %P porcentaje de positividad
- μ micrones
- 2ME 2-mercapto-etanol
- ABTS 2,2'-azino-bis-[3-ethylbenzthiazoline-6-ácido sulfónico]
- ASD agar-suero-dextrosa
- BPA prueba en placa con antígeno tamponado
- Cadena O polisacárido, homopolímero de N-formil-perosamina
- CIE contraimmunoelectroforesis
- CNEA Comisión Nacional de Energía Atómica
- CO₂ dióxido de carbono
- DNA ácido desoxirribonucleico
- DO densidad óptica
- EDTA ácido etilén diamino tetracético
- EGTA etilenglicol bis (β -amino-etil-eter)-*N,N,N',N'*-ácido tetra acético
- ELISA enzima inmunoensayo
- FAO Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
- FC fijación del complemento
- FLA Federación Lanera Argentina
- FPA prueba de la polarización fluorescente
- GMP guanosina 5'-monofosfato
- HRPO peroxidasa de rábano picante
- HS extracto salino obtenido por calentamiento
- ICFTU Unidades Internacionales (prueba de FC)
- IDGA inmunodifusión en gel de agar
- IELISA ELISA indirecta
- Ig inmunoglobulina
- INDEC Instituto Nacional de Estadísticas y Censos
- INEI-ANLIS Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas-Administración Nacional de

Laboratorios e Institutos de Salud, “Dr. C.G. Malbran”

- INRA Institut National de la Recherche Agronomique
- INTA Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
- IRI inmunodifusión radial inversa
- kDA kilo Dalton
- KDO 2-ceto, 3-desoxioctonato
- L lisa
- LPS lipopolisacárido
- LTH linfocitos T colaboradores o helper
- M- mucoide débil
- ME membrana externa
- NaCl cloruro de sodio
- NOA noroeste
- OIE Organización Internacional de Epizootias
- PBST fosfato 0,01M, pH 7,2, cloruro de sodio 0,15M y 0,05% de Tween 20
- PCR reacción en cadena de la polimerasa
- PME proteínas de membrana externa
- R rugosa
- RB rosa de bengala
- RER retículo endoplásmico rugoso
- Ring Test prueba del anillo en leche
- ROC características del operador - receptor
- rRNA ácido nucleico ribosomal
- RSAT prueba rápida de microaglutinación
- SAGPyA Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación
- SAT aglutinación lenta en tubo
- SH₂ anhídrido sulfuroso
- TNF- α factor alfa de necrosis tumoral
- UFC unidad formadora de colonias
- WHO World Health Organization

RESUMEN

La producción ovina representa un rubro importante dentro del sistema agropecuario de la Argentina y la brucelosis causada por *Brucella ovis* es considerada el motivo principal de los problemas reproductivos en esta especie. Si bien a la fecha no ha sido reportada como causa de enfermedad en el humano, hay trabajos que informan sobre la presencia de anticuerpos en sangre de personal expuesto.

La enfermedad se encuentra en todas las regiones del país donde se crían ovinos, con prevalencias que varían de 3 a 50%. Hasta la fecha no existe un programa nacional o provincial para el control, siendo pocos los laboratorios de diagnóstico que ofrezcan un servicio con técnicas de alta sensibilidad y especificidad. El diagnóstico clínico de la infección por *B. ovis*, mediante palpación de los epidídimos y testículos, no es suficientemente sensible y debe considerarse como presuntivo. El único diagnóstico certero es el aislamiento e identificación de la bacteria, pero es un método poco práctico para realizarlo en gran número de animales y un resultado negativo no asegura que el animal no esté enfermo. Para el diagnóstico de rutina el uso de pruebas serológicas está muy difundido, y las recomendadas como más eficientes son: inmunodifusión en gel de agar (IDGA), fijación del complemento (FC) e IELISA.

El primer objetivo del presente trabajo fue identificar pruebas serológicas que además de ser sencillas y prácticas, presenten alta sensibilidad y especificidad. *B. ovis* y *B. canis* comparten componentes antigénicos, por lo cual ambas podrían ser utilizadas como antígeno con resultados similares. Sin embargo el uso de la cepa de *B. canis* (M-) permite desarrollar un antígeno estable, útil para pruebas de aglutinación. Se estudiaron las pruebas de IDGA e IELISA, utilizando antígeno *B. ovis*, en el suero de 225 animales. En las mismas muestras se realizó una prueba rápida de microaglutinación (RSAT), 2-mercapto-etanol RSAT (2ME-RSAT) e IELISA utilizando antígeno *B. canis*. Los valores de corte de las IELISA fueron ajustados por análisis de la curva ROC, usando 51 sueros negativos y 32 sueros positivos; el valor de corte del IELISA-*B. canis* fue de 39% (%P) y el de IELISA-*B. ovis* 51% (%P), con un 100% de sensibilidad y especificidad. De los 32 sueros positivos de la majada infectada RSAT detectó 32 (100%); 2ME-RSAT 29

(91%) y IDGA 31 (97%). De los 142 sueros de animales sospechosos 46 fueron negativos y 56 positivos a todas las pruebas; 16 fueron positivos con RSAT, IELISA-*B. canis* e IELISA-*B. ovis*; 20 positivos solo con RSAT y 2 positivos con ambas IELISA. RSAT por ser simple de realizar y fácil de interpretar puede utilizarse como prueba tamiz en reemplazo de IDGA, para el diagnóstico de brucelosis ovina causada por *B. ovis*. Los IELISA-*B. canis* e IELISA-*B. ovis* pueden ser utilizados indistintamente como pruebas confirmatorias, ya que muestran igual sensibilidad y especificidad.

Un segundo objetivo fue investigar la presencia de anticuerpos en leche de ovejas.

La leche es una muestra clínica poco estudiada para el diagnóstico de brucelosis causada por *B. ovis* y tiene la ventaja de tomarse en forma rápida y no invasiva. En el presente trabajo se evaluaron 144 ovejas en lactancia, a las cuales se les tomaron muestras de sangre y leche simultáneamente, efectuándose estudios bacteriológicos, serológicos y búsqueda de anticuerpos en leche utilizando antígenos *B. canis* y *B. ovis*. En leche se realizaron las pruebas de IELISA con antígeno *B. canis* y *B. ovis* y en suero: RSAT, IDGA e IELISA con los mismos antígenos. Las 75 ovejas de un establecimiento libre de brucelosis, bacteriológicamente negativas, presentaron serología negativa a las pruebas de RSAT e IELISA-*B. canis* y a IDGA e IELISA-*B. ovis*. El valor de corte se ajustó por análisis de la curva ROC usando los valores de los IELISA-*B. canis* y *B. ovis* de las 75 ovejas negativas y 23 muestras de 5 ovejas infectadas, siendo %P 33 para IELISA-*B. canis* y %P 26 para IELISA-*B. ovis*; resultando la prueba en un 100% de sensibilidad y especificidad. De las 64 muestras de una majada bacteriológicamente negativa, pero sospechosa de tener la enfermedad, 11 resultaron positivas a las pruebas de IELISA-*B. canis* y *B. ovis* en leche.

Sobre la base de los resultados obtenidos se propone para el diagnóstico de brucelosis de ovejas en lactancia, la prueba de IELISA en leche con antígeno *B. canis* o *B. ovis*.

Summary

The ovine production is economically important in the agricultural system of Argentina and brucellosis, caused by *Brucella ovis*, is considered the main factor causing reproductive problems in this species. Although it has not been reported as a disease in humans, there are studies showing that antibodies were detected in workers in contact with ovines. The disease is found in all the areas of the country where ovines are bred, with an incidence varying from 3 to 50%.

To date, there is no national or provincial programme for its control, and very few laboratories offer a diagnostic service with high sensitive and specific techniques.

The clinical diagnoses of *B. ovis* infection by palpating the testicles and epididymides are not sensitive enough and it must be considered presumptive. Although bacteriological diagnosis is recommended as a confirmatory test, this method is inadequate for detection of the disease in large numbers of ovines, since it fails to detect all the infected animals. Indirect methods of serological testing are preferred for routine diagnosis, among which, agar gel immunodiffusion (AGID), complement fixation (CF) and ELISA test are considered the most efficient.

The first objective of the present study was to identify simple and practical serological tests with high sensitivity and specificity.

Since *B. ovis* shares antigenic components with *Brucella canis*, similar results are expected if either strain is used as an antigen. However, the advantage of the *B. canis* (M-) strain variant is that it can be used to develop a satisfactory antigen for agglutination test.

We present data (testing 225 animals) on AGID and ELISA test using *B. ovis* antigen, and rapid screening agglutination test (RSAT), 2-mercapto-ethanol RSAT (2ME-RSAT) and ELISA using *B. canis* antigen. The cut-off value was adjusted by ROC analysis using 51 negative and 32 positive sera. The ELISA-*B. canis* cut-off value was 39 (%P) and ELISA-*B. ovis* 51 (%P), with 100% sensitivity and specificity. Considering the 32 positive sera from the infected flocks, RSAT detected 32 (100%), 2ME-RSAT 29 (91%) and AGID 31 (97%). Taken into account the 142 sera from suspicious flocks, 46 were negative and 56 positive in all the tests; 16 were positive by RSAT, ELISA-*B. canis* and ELISA-*B. ovis*, 20

positive only with RSAT and 2 positive only by both ELISAs. RSAT is a very sensitive screening test that due to its simplicity and easy interpretation, could replace AGID as a screening test for diagnosis of ovine brucellosis caused by *B. ovis*, with large number of samples. ELISA-*B. canis* or ELISA-*B. ovis* tests could be used as confirmatory tests, since they show equal specificity and sensitivity.

A second objective was to investigate the presence of antibodies in sheep milk. Milk is a clinical sample not enough studied in the diagnosis of ovine brucellosis caused by *B. ovis*, although it has the advantage that samples may be taken quickly in a non invasive manner. Thus, we studied 144 samples of milk and sera from lactating ewes, comparing bacteriological studies, serological and milk tests using *B. canis* and *B. ovis* antigens.

ELISA was done on milk samples with *B. canis* and *B. ovis* antigens, while serum samples were studied following RSAT, IDGA and ELISA tests using the same antigens. A group of 75 ewes in an uninfected flock were serologically negative to RSAT, ELISA-*B. canis*, AGID and IELISA-*B. ovis*.

The cut-off values were adjusted by ROC analysis using 75 uninfected sheep and 23 positive samples from 5 infected sheep. The results showed cut off values of (%P) 33 for milk-IELISA-*B. canis* and (%P) 26 for a milk-IELISA-*B. ovis*, with 100% sensitivity and specificity. Considering the 64 samples from the suspect flock (data not shown) 11 were positive by milk-IELISA-*B. canis* and milk-IELISA-*B. ovis*.

Based on our results, we suggest that with large number of samples, the milk-IELISA-*B. canis* could be considered a suitable test for the diagnosis of *B. ovis* Brucellosis in lactating ewes.

Resum

La producció ovina representa un rubro important dins del sistema agropecuari de l'Argentina i la brucelosi causada per *Brucilla Ovis* és considerada com el principal motiu dels problemes reproductius en aquesta espècie. Si bé a la data no ha estat reportada com causa de malaltia a l'humà, hi ha treballs que informen sobre la presència d'anticossos en sang de personal exposat.

La malaltia es troba a totes les regions del país on es crien ovelles, amb prevalències que varien de 3 a 50%. Fins ara, no existeix un programa nacional o provincial per al control, sent pocs els laboratoris de diagnòstic que ofereixen un servei amb tècniques d'alta sensibilitat i especificitat. El diagnòstic clínic de la infecció per *B.bovis*, mitjançant palpació dels epidídims i testicles, no és suficientment sensible i ha de considerar-se com a presuntiu. L'únic diagnòstic realment creïble és l'aïllament i identificació del bacteri, però és un mètode poc pràctic per a realitzar-lo en gran nombre d'animals i un resultat negatiu no assegura que l'animal no estiga malalt. Per al diagnòstic de rutina l'ús de proves serològiques està molt difós, i les recomanades com més eficients són: immunodifusió en gel d'agar (IDGA), fixació del complement (FC) i IELISA.

El primer objectiu del present treball va ser identificar proves serològiques que, a més de ser sencillez i pràctiques, presenten alta sensibilitat i especificitat. *B. ovis* i *B.canis* comparteixen components antigènics, per la qual cosa ambdues podrien ser utilitzades com antigen amb resultats similars. No obstant això, l'ús de la soca de *B. canis* (M-) permet desenvolupar un antigen estable, útil per a una prova ràpida de microaglutinació. Es van estudiar proves de IDGA i IELISA, utilitzant antigen *B. ovis* al sèrum de 225 animals. En les mateixes mostres es realitzà una prova ràpida de microaglutinació (RSAT), 2-mercaptoetanol RSAT (2ME-RSAT) i IELISA utilitzant l'antigen *B.canis*. Els valors de tall de les IELISA foren ajustats per anàlisi de la corba ROC, utilitzant 51 sèrums negatius i 32 sèrums positius; el valor de tall del IELISA-*B.canis* va ser de 39% (%P) i el de IELISA-*B.ovis* 51% (%P), amb un 100% de sensibilitat i especificitat. Dels 32 sèrums positius de la pleta infectada RSAT va detectar 32 (100%); 2Me-RSAT 29 (91%) i IDGA 31 (97%). Dels 142 sèrums d'animals sospitosos 46 van ser negatius i 56 positius a totes les proves; 16 fóren positius amb RSAT, IELISA-*B.canis* i IELISA-*B.ovis*; 20

positius solament amb RSAT i 2 positius amb ambdues IELISA. RSAT per ser simple de realitzar i fàcil d'interpretar pot utilitzar-se com a prova tamís en reemplaçament de IDGA, per al diagnòstic de brucelosi ovina causada per B. ovis. Els IELISA-B. canis i IELISA-B. ovis poden ser utilitzats indistintament com a proves confirmatòries, ja que mostren igual sensibilitat i especificitat.

Un segon objectiu va ser investigar la presència d'anticossos en llet d'ovelles.

La llet és una mostra clínica poc estudiada per al diagnòstic de brucelosi causada per B. ovis i té l'avantatge de prendre's en forma ràpida i no invasiva. En el present treball es van avaluar 144 ovelles en lactància, a les quals se'ls van prendre mostres de sang i llet simultàniament, efectuant-se estudis bacteriològics, serològics i recerca d'anticossos en llet utilitzant antígens B. canis i B. ovis. A la llet es van realitzar les proves de IELISA amb antigen B. canis i B. ovis i al sèrum: RSAT, IDGA i IELISA amb els mateixos antígens. Les 75 ovelles d'un establiment lliure de brucelosi, bacteriològicament negatives, presentaren serologia negativa a les proves de RSAT i IELISA-B. canis i a IDGA i IELISA-B. ovis. El valor de tall es va ajustar per anàlisi de la corba ROC utilitzant els valors dels IELISA-B. canis i B. ovis de les 75 ovelles negatives i 23 mostres de 5 ovelles infectades, sent %P 33 per a IELISA-B. canis i %P 26 per a IELISA-B. canis; resultant la prova en un 100% d'especificitat i sensibilitat. De les 64 mostres d'una pleta bacteriològicament negativa, però sospitosa de tenir la malaltia, 11 van resultar positives a les proves de IELISA-B. canis i IELISA-B. ovis en llet.

Basant-se en els resultats obtinguts es proposa per al diagnòstic de brucelosi d'ovelles en lactància, la prova d'IELISA en llet amb antigen B. canis o B. ovis.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1.- INTRODUCCIÓN	17
1.1. Producción ovina en Argentina	17
1.2. Programas sanitarios	20
1.3. Brucelosis en animales domésticos	22
1.4. Aspectos históricos de la Brucelosis	23
1.5. El género <i>Brucella</i>	25
2.- BRUCELOSIS OVINA: antecedentes	29
2.1. Brucelosis ovina causada por <i>B. ovís</i>	29
2.2. La enfermedad en el mundo	30
2.3. Epidemiología	30
2.4. Patogénesis	34
2.5. Diagnóstico clínico	39
2.6. Diagnóstico bacteriológico	41
2.7. Estructura antigénica	45
2.8. Respuesta inmunitaria humoral	50
2.9. Diagnóstico serológico	52
3.- PRIMER OBJETIVO: Uso de un antígeno de <i>B. canis</i> para detectar anticuerpos anti <i>B. ovís</i> en el suero de ovinos.	64
3.1 Planteo del objetivo del experimento	64
3.2 Materiales y métodos	66
3.3 Resultados	72
3.4 Discusión	74
4.- SEGUNDO OBJETIVO: Detección de anticuerpos anti <i>B. ovís</i> en leche de ovejas, utilizando un antígeno de <i>B. canis</i>	79
4.1 Planteo del objetivo del experimento	79

4.2 Materiales y métodos	81
4.3 Resultados	85
4.4 Discusión	87
5.- CONCLUSIONES	91
6.- BIBLIOGRAFIA	94

ÍNDICE DE FIGURA, GRAFICOS Y TABLAS

Gráfico 1	Existencias de ganado ovino	18
Figura 1	Zonas de producción ovina en Argentina	19
Tabla 1	Especies del género <i>Brucella</i>	27
Tabla 2	Comparación de sensibilidad y especificidad de distintos IELISA para el diagnóstico de <i>B. ovis</i> en suero de ovinos	60
Gráfico 2	Distribución de frecuencias de IELISA- <i>B. canis</i> para detectar anticuerpos de <i>B. ovis</i> en 51 muestras de sueros	73
Gráfico 3	Distribución de frecuencias de IELISA- <i>B. ovis</i> para detectar anticuerpos de <i>B. ovis</i> en 51 muestras de sueros	73
Tabla 3	Resultados serológicos, clínicos y bacteriológicos de 32 ovinos RB negativo	76
Tabla 4	Resultados serológicos de 142 sueros ovinos sospechosos de tener brucelosis causada por <i>B. ovis</i>	77
Gráfico 4	Diagrama interactivo de puntos de los resultados de IELISA- <i>B. canis</i> (A) e IELISA- <i>B. ovis</i> (B) en 98 muestras de leche [75 negativas y 23 positivas]	86
Tabla 5	Estudios bacteriológicos y pruebas para detectar anticuerpos anti <i>B. ovis</i> en leche y suero de 5 ovejas en lactancia	88

1. INTRODUCCIÓN

1. 1. Producción ovina en Argentina

La producción ovina representa un rubro importante dentro del sistema agropecuario de nuestro país. Tradicionalmente Argentina orientó la explotación del ganado ovino hacia la obtención de lana, fundamentalmente en la Patagonia, donde por el ambiente es difícil desarrollar otra actividad agropecuaria. En función de esta tradición lanera, más del 50% del stock ovino argentino corresponde a razas productoras de lana (Merino) y doble propósito (Corriedale, Romney Marsh, Lincoln) y Criolla. Sólo una raza es netamente productora de carne, la Hampshire Down (Asad, 2006), y en los últimos años se han comenzado a criar razas destinadas a la producción de leche (Frisona, Manchega y Pampinta) (McCormick y col., 2003).

Se estima que los primeros ovinos llegaron al suelo rioplatense hacia 1549, cuando Ñuflo de Chaves al retornar de Lima (Perú), introdujo cabras y ovejas en Asunción (Paraguay). Aunque algunos historiadores sostienen que los primeros animales llegados al nuevo mundo eran Merinos, Wernicke (1933) afirma que eran ovejas ordinarias de razas Siria, Pirenaica y Berberisca. Esto parece más probable, ya que en esa época la corona de España tenía prohibida la exportación de raza Merino y el fenotipo de los actuales ovinos Criollos, explotados en la región noroeste (NOA) del país se asemeja más al aspecto de los actuales ovinos de raza Churra española (De Gea, 2004).

Argentina a fines del siglo XIX contaba con 74 millones de ovinos, número que se fue reduciendo con el correr de los años. Al analizar la evolución de las existencias ovinas en las últimas décadas se observa una reducción sustancial. Como se puede apreciar en el gráfico 1, en el año 1960 el rebaño superaba los 48 millones de cabezas, y en el año 2002 sólo llegaba a 12,5 millones (INDEC 2002), aunque los informes de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación en el año 2006 estiman 15% más que el último dato oficial (Boletín ovino, 2006; Asad, 2006).

Esta merma obedece a múltiples factores entre los cuales se pueden mencionar la desertificación en la Patagonia; la expansión de la frontera agrícola; el reemplazo del ovino por el ganado bovino por menores costos de mano de obra; menor susceptibilidad a la predación; los vaivenes en el mercado internacional; mercados y canales de comercialización poco transparentes para el productor y escasa

aplicación de tecnología en la producción ovina, en comparación con otras actividades competitivas (Müeller, 1998).

La producción de lana ha sido calculada en 65 mil toneladas base sucia para la zafra 2002/2003, exportándose 43 mil toneladas (FLA, 2006).

La producción de carne se estimó en 50 mil toneladas en el año 2001 (FAO), de las cuales se registraron 8 mil toneladas en frigoríficos habilitados (SAGPyA). La exportación de carne ovina en el año 2003 fue de 4,7 mil toneladas (SAGPyA). La faena registrada en la zafra 2005/2006 alcanzó un total de 1,6 millones de ovinos y la exportación de carne para esta zafra fue de 8,2 mil toneladas (SAGPyA). Argentina tiene un cupo máximo de exportación para la Unión Europea de 18 mil toneladas. En cuanto al mercado interno las posibilidades de consumo de carne ovina son promisorias, ya que en los últimos años se están buscando sustitutos de la carne bovina, debido al incremento de los precios de esta última. Ambas situaciones demuestran el potencial que tiene la producción de carne ovina.

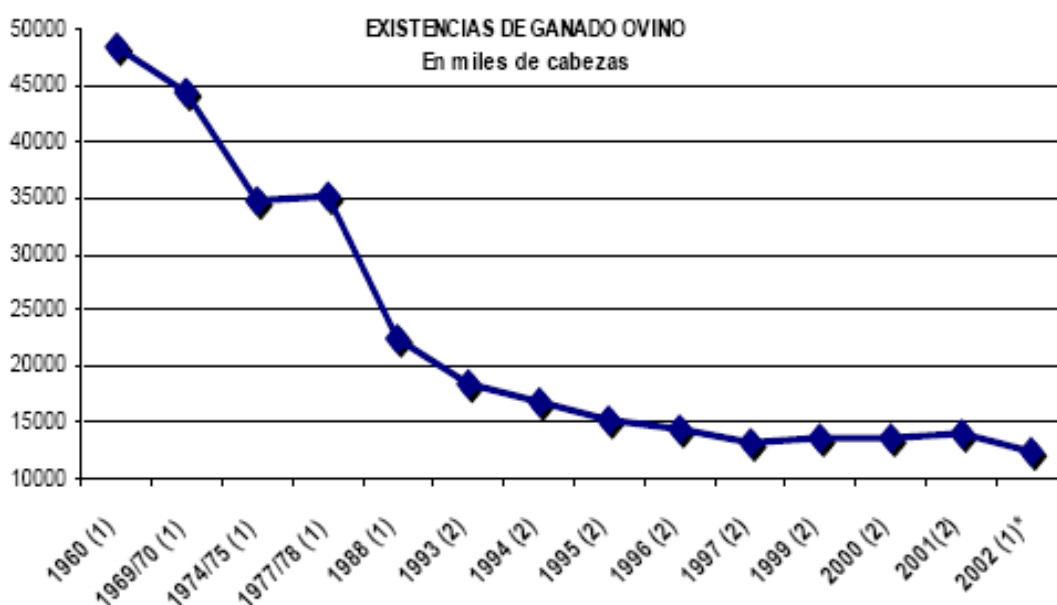


Grafico 1

Fuente: (1) Censos INDEC.
(2) Encuesta Nacional Agropecuaria SAGPyA e INDEC.
Elaboración: Dto. De Ovinos y Lanas – SAGPyA.

Las zonas productivas son cuatro (figura 1):

- Patagonia: ovinos para lana en sistemas de producción extensivos. Las razas predominantes son Merino, Corriedale y cruza.
- Mesopotamia: sistemas mixtos, ovinos doble propósito, producción de lana y carne. La raza predominante es Corriedale, seguida por Romney Marsh e Ideal.
- Noroeste (NOA): explotaciones minifundistas, con una ganadería de subsistencia, donde predomina la raza Criolla.
- Provincia de Buenos Aires: sistemas mixtos agrícolas ganaderos, ovinos doble propósito. La raza que presenta mayor número de animales es Corriedale aunque se encuentran ejemplares de Romney Marsh, Hampshire Down, Texel y Lincoln (Müller, 1998).

La región patagónica concentra el 67% del total de ovinos (8,3 millones), la provincia de Buenos Aires el 11% (1,4 millones), la región mesopotámica el 10% (1,2 millones) (Asad, 2006), y el NOA el 5% (750 mil) (INDEC, 2002).

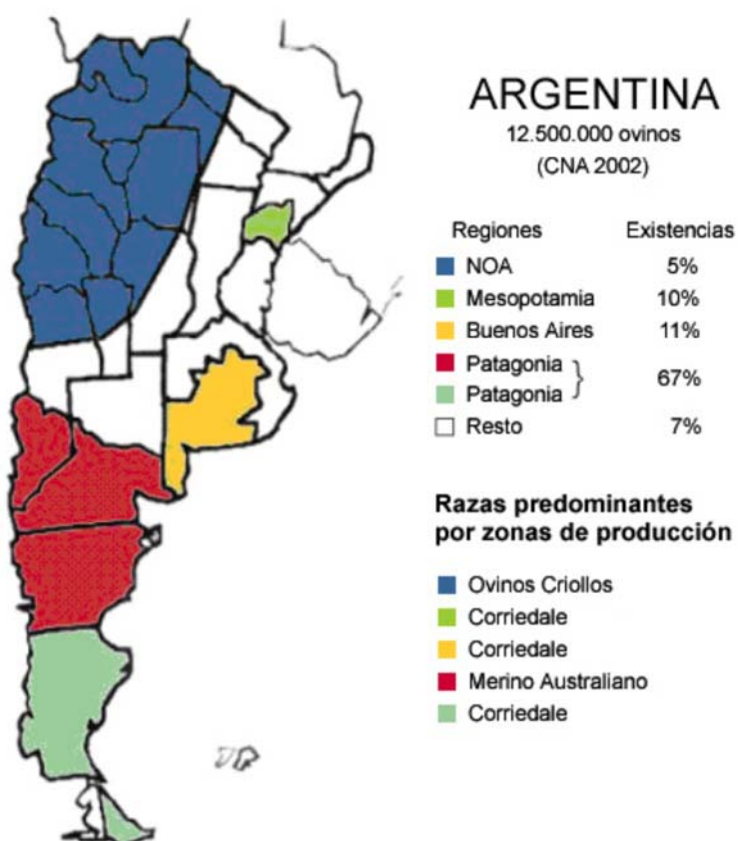


Figura 1: Zonas de producción ovina en Argentina

Si nos circunscribimos al ámbito de la provincia de Buenos Aires, el número de ovinos en el año 1988 era de 4,527 millones y en el año 2002 de 1,415 millones, aunque se estima que actualmente ha evolucionado positivamente (Milicevic, 2005). La cría de ganado ovino puede representar una opción interesante para muchos productores agropecuarios.

Sin embargo se deberían superar los actuales niveles productivos y costos de producción para que esta sea una actividad competitiva. La eficiencia productiva es altamente sensible a la tasa reproductiva efectiva (excedente de animales para venta). Con porcentajes de señalada que raramente superan el 90%, se está lejos de explotar la capacidad reproductiva de la especie. Para abastecer el mercado interno y la demanda internacional se necesita contar con animales para faena, continuidad de la oferta y buena calidad de la res. Para lograr las mejoras necesarias hay que optimizar el manejo nutricional, reproductivo, genético y sanitario (Müller, 1998).

1. 2. Programas sanitarios

La sanidad es uno de los pilares básicos de la producción; junto con la genética, el manejo y la alimentación. En establecimientos que efectúan un correcto manejo de la sanidad, aplicando planes preventivos, las inversiones en este rubro representan entre el 6% al 12% del total de gastos anuales (Bonino y col. 1992).

La presencia de una enfermedad infecciosa en los ovinos determina pérdidas y baja eficiencia reproductiva, que muchas veces es difícil de identificar y seguramente impide el progreso de selección genética y de fertilidad en la majada (Paolicchi, 2005).

Las diferentes causas de pérdidas reproductivas en ovinos pueden ser infecciosas o no infecciosas (Peter, 2002). Dentro de las primeras se encuentran las no específicas y las específicas (Bonino y col., 1987).

En el caso de los carneros se pueden mencionar como causas inespecíficas de epididimitis las infecciones por: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Pasteurella multocida*, *Escherichia coli*, *Brucella abortus* (Bulgin, 1990), *Haemophilus* sp., *Chlamydomphila abortus* (antes *Chlamydia*

psittaci) (OIE, 2004a). Los agentes infecciosos específicos están conformados por una variedad de bacterias llamadas genéricamente bacilos pleomórficos gram-negativos. Estos últimos corresponden en su mayoría al grupo *Histophilus ovis* y al grupo *Actinobacillus seminis*, que afectan a borregos de hasta dos años de edad (Bulgin, 1990; Robles, 1992; Bonino y Cavestany, 2005; Acosta Dibarrat y col., 2006). Aunque en el caso de *A. seminis* se ha encontrado serología positiva en carneros de hasta 5 años (Méndez Nárez y col., 1999).

En las ovejas las causas de infertilidad de origen infeccioso son las que cursan con interrupción de la gestación en cualquiera de sus etapas o provocando el nacimiento de crías débiles, que mueren prematuramente (Bonino y col., 1987). Los gérmenes responsables pueden ser:

- Bacterias (*Brucella ovis*; otras *brucellas*; *Campylobacter fetus*; *Listeria monocytogenes*, *Salmonella abortus ovis*; *Salmonella dublin*, *Leptospiras* y otras bacterias).
- Rickettsias (*Coxiella burnetti*; *Ehrlichia phagocytophila*).
- Clamidas (*Chlamydomphila abortus*).
- Virus (*Pestivirus*, *Arbovirus*, *Orbivirus*).
- Hongos (*Aspergillus fumigatus*; otros hongos).
- Protozoos (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*) (Bonino y Sienna, 1987; Bonino y Cavestany, 2005).

En machos y hembras entre las causas no infecciosas se mencionan las congénitas, medicamentosas, nutricionales, metabólicas, tóxicas, traumáticas y estrés (Peter, 2002).

La brucelosis causada por *B. ovis* es considerada el principal motivo de los problemas reproductivos en ovinos en la República Argentina (Paolicchi, 2005), y también en otros países productores de esta especie animal. Desde 1952 en Nueva Zelanda y a partir de 1961 en Argentina, *B. ovis* ha sido identificada como responsable de infecciones genitales en carneros y problemas de infertilidad en hembras con pérdidas de corderos. En los países donde se han medido las mermas ocasionadas por esta enfermedad se encontró que la disminución en la producción de corderos alcanzó el 20%, y la reducción en el nacimiento de mellizos hasta el

10% (Bonino y Cavestany, 2005; Paolicchi, 2005), demostrando el impacto de la infección en los índices reproductivos y en las pérdidas económicas.

En Argentina la enfermedad se encuentra en todas las regiones del país donde se crían ovinos, con prevalencias que varían de 3% a 50% (Robles, 1992). Si bien nunca se realizó un relevamiento nacional, en la provincia de Corrientes las prevalencias a nivel departamental varían entre un 11% y 21% (Draghi y col., 1984). En Río Negro, Neuquén y Chubut las prevalencias varían de 4% a 10% y de 8% a 20% en Santa Cruz y Tierra del Fuego (Robles, 1998). Un relevamiento serológico que abarcó quince partidos de la provincia de Buenos Aires y uno de Santa Fe, efectuado entre los años 1998 y 2002, sobre un total de 2652 muestras, encontró 12,9% de animales positivos (Späth y col., 2002).

No obstante, no existe un programa en el orden nacional o provincial para el control de esta enfermedad y son pocos los laboratorios de diagnóstico que ofrecen un servicio con técnicas de alta sensibilidad y especificidad (Späth y col., 2002).

1. 3. Brucelosis en animales domésticos

Entre las enfermedades infecciosas que afectan a las distintas especies animales, la brucelosis ocupa un lugar de relevancia, por los serios perjuicios económicos que ocasiona en la producción ganadera y en la salud pública (Crespo León, 1994; Pennimpede, 1998; Wallach, 1998).

Se trata de una enfermedad compleja, que presenta distintas modalidades epidemiológicas (Orduña y col., 2001a). Aunque la sintomatología varía según la especie, la característica principal en los animales es la infección del tracto reproductivo con tendencia a la cronicidad, tanto en hembras como en machos. (Nicoletti, 1989; López Merino, 1992; Corbel, 1997).

Orduña y col. (2001a) la consideran una antropozoonosis que tiende a producir infecciones crónicas tanto en el hombre como en los animales, manteniéndose como la zoonosis principal en algunos países.

De las seis especies de *Brucella* conocidas en la actualidad, cuatro afectan al ser humano, siendo este un huésped accidental que adquiere la enfermedad por

contacto, inhalación o ingestión de productos animales o sus derivados (López Merino, 1992; Lucero, 1996; Orduña y col., 2001a).

Crespo León (1994) considera que la erradicación de esta enfermedad debiera constituir uno de los principales objetivos de la sanidad animal, cuya finalidad es conseguir una mayor rentabilidad de los recursos ganaderos, disminuyendo los costos de producción y facilitando el comercio internacional de animales vivos y de sus producciones.

1.4 Aspectos históricos de la brucelosis

La descripción más antigua de la enfermedad que se conoce fue hecha por Hipócrates, en el año 377 antes de Cristo (Crespo León, 1994).

En la isla de Malta en 1887 un médico de la armada británica, David Bruce, aisló del bazo de cuatro soldados fallecidos una bacteria que llamó "*Micrococcus melitensis*", en honor al antiguo nombre romano de la isla. Actualmente se conoce como *Brucella melitensis* (Crespo León, 1994).

En el año 1897, Bang y Stribolt, profesores de la Escuela Superior de Veterinaria de Copenhague, aislaron y describieron, por primera vez, un microorganismo obtenido de fetos y anexos fetales de vacas, al que denominaron "*Bacillus abortus*", estableciendo la etiología del "*aborto infeccioso*" en el ganado bovino.

En 1905 el médico maltés Zammit, comprobó que los productos lácteos no pasteurizados o hervidos, provenientes de cabras infectadas, eran la fuente de infección para el hombre (Crespo León, 1994).

En 1914, Traum aisló una nueva especie de *Brucella* a partir de fetos porcinos. El microorganismo se parecía, morfológica y culturalmente a *B. abortus*, pero difería en algunas características bacteriológicas, siendo denominado "*American melitensis*", actualmente *B. suis*.

Evans, en 1918 confirmó experimentalmente las estrechas relaciones taxonómicas existentes entre *B. abortus* y *B. melitensis* (Orduña y col., 2001a).

En 1920, Meyer y Show, crearon el género *Brucella*, que incluía dos especies: *Brucella melitensis* y *Brucella abortus* y años más tarde se anexó *Brucella suis* (Lucero, 1996).

En el año 1953 se aisló una nueva especie, que se denominó *Brucella ovis*, a partir de un proceso patológico conocido como epididimitis contagiosa del carnero. En 1957 Stoenner y Lackman aislaron la quinta especie de este género de la rata del desierto, *Neotomae lepidae*, en el Oeste de EEUU, que se denominó *Brucella neotomae*. Esta última fue aceptada como especie, pero *B. ovis* debió esperar 18 años para ser reconocida (Lucero, 1996).

En 1968 en EEUU Carmichael y Bruner, aislaron de fetos caninos de raza Beagle, una nueva especie conocida como *Brucella canis* (Crespo León, 1994; Lucero, 1996).

En 1994 Ewalt y col., describieron otra especie, que llamaron *Brucella maris*. Entre los animales afectados se encuentran pinnípedos, cetáceos y nutrias, de los cuales, en algunos casos se ha cultivado la bacteria y en otros, solo se ha detectado respuesta humoral (Ross y col., 1996; Blank y col., 2002; Medical Progress, 2005). Esa nueva especie sería capaz de producir abortos en las especies de mamíferos marinos afectados, al igual que otros microorganismos pertenecientes a ese género (Ewalt y col. 1994; Blank y col., 2002). Los estudios genómicos llevados a cabo en cepas de origen marino y las especies clásicas terrestres demuestran que son diferentes (Orduña y col., 2001a).

En el Continente Americano no se puede establecer con exactitud la aparición de la enfermedad. Algunos autores consideran que los orígenes de la brucelosis se remontan a la época de la conquista y que pudo ingresar a América con los animales domésticos importados de España y de otros países europeos (García Carrillo, 1987).

La historia de la brucelosis en el país tiene sus comienzos en el año 1892, cuando Bernier, describió la enfermedad en bovinos de la provincia de Buenos Aires. Villafañe y Rosembusch, en 1913 y 1917 respectivamente, confirmaron la presencia de la infección en los rodeos del país (Robles, 2003). En el año 1930, Fernández Ithurrat comunicó el primer aislamiento de *B. melitensis* de una persona de la provincia de Mendoza. En equinos la primera comprobación serológica la realizó Quevedo en el año 1939 (García Carrillo, 1987). En el ganado ovino la infección por *B. melitensis* fue diagnosticada serológicamente en las provincias de La Pampa, Río Negro y Chubut en el año 1932 y en el año 1962 Szyfres y Chappel (1962) aislaron *B. ovis*, agente causal de la epididimitis de los carneros (García Carrillo, 1987). Acosta y Biran (1950), estudiaron muestras de

cerdos de un frigorífico de la provincia de Corrientes en el año 1947, encontrando 23,5% de reaccionantes. A partir de la década del 70 se informó la presencia de *Brucella canis* en el país (Miranda y Báez, 2005), afectando a caninos y al ser humano. Hasta el presente no se ha descrito la presencia de *B. maris* en Argentina.

1.5 El género *Brucella*

Las especies del género *Brucella* son cocobacilos gram-negativos, que miden 0,5 a 0,7 micrones (μ) de ancho y entre 0,6 a 1,5 μ de longitud, son patógenos intracelulares facultativos que no esporulan, no presentan cápsula ni coloración bipolar y carecen de flagelos, de fimbrias, exotoxinas, plásmidos o fagos lisogénicos, y su lipopolisacárido (LPS) posee menor actividad endotóxica que el hallado en otras bacterias gram-negativas (Moriyón y col., 2001; Moreno y Moriyón, 2001; Lucero, 1996; 2004). Son aeróbicos e inmóviles, su metabolismo es respiratorio y tienen un sistema citocromo basado en el transporte de electrones, con oxígeno o nitrato como aceptor terminal. Producen nitrato reductasa. *B. ovis* y algunos biovars de *B. abortus* requieren 3-5% de dióxido de carbono (CO_2) suplementario para su desarrollo, especialmente en aislamientos primarios. La temperatura óptima de crecimiento es de 37°C. La mayoría de las cepas pierde su viabilidad a 56°C, aunque para la esterilización se necesitan temperaturas superiores a los 80°C. El pH normal de crecimiento oscila entre 6 y 7,4, mueren a pH menores de 3,5 (Lucero, 1996).

Las brucelas no producen indol, no licuan gelatina y no producen acetil-metil carbinol (prueba de Voges-Proskauer). No lisan glóbulos rojos y dan resultados negativos a la prueba de rojo de metilo. Son catalasa positivas y, con excepción de *B. ovis* y *B. neotomae*, también oxidasa positivas. Son quimioorganotrofas y su crecimiento mejora con el agregado de suero al medio de cultivo. No producen ácidos en medios con carbohidratos, excepto *B. neotomae* (Lucero, 1996).

En la coloración de Gram modificada por Hucker y con objetivo de inmersión, aparecen como gram-negativas, con forma de pequeños cocobacilos o bastones. Resisten la decoloración por ácidos débiles y se tiñen de rojo contra fondo azulado por el método de Ziehl-Neelsen modificado por Stamp. Por el método de

Koster, modificado por Chistofferson y Ottesen, las brucelas se tiñen de rojo anaranjado contra fondo azul, aunque *B. ovis* toma color azul (Lucero, 1996).

Las colonias de *B. ovis* y *B. canis* son rugosas estables, mientras que las otras especies del género son lisas, aunque tienden a disociarse en formas rugosas (Blasco y Marín, 1990; Lucero, 1996).

El aspecto que adquieren las colonias se debe a la expresión del LPS en la superficie bacteriana, LPS-S en las lisas y LPS-R en las rugosas. El carácter liso o rugoso radica en la presencia o ausencia, respectivamente, de la cadena O (polisacárido, homopolímero de N-formil-perosamina) del LPS (Blasco y Gamazo, 1994). *B. ovis* y *B. canis*, especies estables en fase R, presentan el LPS-R con una cadena O de tamaño reducido (Moriyón, 1986).

Los requerimientos nutricionales del género *Brucella* son complejos: el de nitrógeno se cumple adicionando al medio de cultivo mezclas de aminoácidos, que suplen los compuestos balanceados aminados y de sales de amonio. El magnesio es necesario para el crecimiento y no puede ser reemplazado por el manganeso. Como factor de crecimiento debe agregarse tiamina, biotina y pantotenato de calcio. La presión osmótica óptima se ubica entre 2 y 6 atmósferas, equivalentes a 0,05-0,15 M de cloruro de sodio (NaCl). Los iones sodio y potasio parecen ser intercambiables (Lucero, 1996).

La mayoría de las cepas producen nitrato reductasa y reducen los nitratos a nitritos, con excepción de *B. ovis* y algunas cepas de *B. canis* (Lucero, 1996).

Actualmente, se han determinado las secuencias de los genomas de *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* y *B. ovis* (Lucero, 2004; Chain y col., 2005).

El ácido desoxirribonucleico (DNA) de *Brucella* contiene un 58-59% de guanina + citosina y el tamaño total del genoma se ha estimado en $3,2 \times 10^6$ pares de bases (Moriyón y col., 2001). Se ha confirmado la presencia de 2 cromosomas circulares, uno de los cuales tiene el doble del tamaño que el otro (Lucero, 2004).

El análisis del ácido nucleico ribosomal (16S rRNA), la composición lipídica y aspectos de su fisiología y biología, ubican al género *Brucella* dentro de la subdivisión α -2 de la Clase *Proteobacteria*, en la que están también otros patógenos intracelulares animales (*Rickettsias*), así como destacados patógenos y endosimbiontes de vegetales (*Agrobacterium* y *Rhizobium*). La asociación intracelular con eucariotas es una tendencia evolutiva compartida con otros miembros de esta subdivisión α -2 (Moreno y col., 1990; Moriyón y col., 2001).

Si bien los estudios de hibridación DNA-DNA determinaron que todos los miembros del género presentan más del 95% de homología, y se lo considera un género monoespecífico (Verger y col., 1985), la antigua clasificación en 6 especies, basada en la preferencia de huésped, características fenotípicas, antigénicas y bioquímicas, sigue siendo utilizada (Osterman y Moriyon, 2006) (Tabla 1).

Sin embargo hay estudios que indican que la estructura y organización genómica de una especie o aún de cada biovar dentro de una especie, tiene características únicas y distintivas, lo que sugiere que el género consiste en linajes clonales, cada uno adaptado en forma específica, aunque no exclusiva, a un huésped mamífero (Michaux-Charachon y col., 1997; Jumas-Bilak y col., 1998; Moreno y col., 2002).

Se ha demostrado que la expresión genética de *Brucella* varía según ciertas condiciones como el ambiente hostil de los fagocitos, y también que es diferente en los medios de cultivo normales y en los macrófagos. Esto supone la existencia de sistemas sensores-reguladores, de los cuales se han descrito dos, que dependen de estímulos ambientales. Uno de ellos regula genes esenciales para la virulencia, modula las propiedades de la membrana externa y se relaciona con la habilidad de penetrar en células fagocíticas (Moriyón y col., 2001).

Especie	1ª Descripción	Morfología de las Colonias	Biovar	Patogeneidad para el hombre	Huésped natural preferido
<i>B. melitensis</i>	1887	Lisa	1	Alta	Cabras y Ovinos
			2	Alta	
			3	Alta	
<i>B. abortus</i>	1897	Lisa	1	Moderada	Bovinos
			2	Moderada	
			3	Moderada	
			4	Moderada	
			5	Moderada	
			6	Moderada	
<i>B. suis</i>	1914	Lisa	9	Moderada	Cerdos y Liebres
			1	Alta	
			2	Sin Notificación	
			3	Alta	
			4	Moderada	
<i>B. ovis</i>	1953	Rugosa	-	Alta	Cerdos
<i>B. neotomae</i>	1957	Lisa	-	Sin Notificación	Ovinos
<i>B. canis</i>	1968	Rugosa	-	Sin Notificación	Ratas
				Baja	Caninos

Tabla 1 – Especies del Género *Brucella*

Si bien existe una marcada predilección de *Brucella* sp. por el huésped natural, pueden producirse infecciones cruzadas con otras especies de animales domésticos o silvestres y adaptaciones al medio (Lucero, 1996). Las brucelas rugosas estables (*B. canis* y *B. ovis*) presentan alto grado de especificidad de hospedador (Crespo León, 1994).

2. BRUCELOSIS OVINA: antecedentes

2. 1. Brucelosis ovina, causada por *Brucella ovis*

El ovino es susceptible de ser infectado por dos especies, *B. melitensis* y *B. ovis*; la infección por *B. melitensis* es común en aquellos lugares donde la cría de ovinos se desarrolla en estrecho contacto con la de caprinos. Esporádicamente han sido observadas infecciones por *B. abortus* y *B. suis* (OIE, 2004a).

En España, país donde la mayoría de los casos de brucelosis en humanos se deben a *B. melitensis*, se ha comprobado la existencia de la enfermedad en el ganado ovino y caprino (Blasco, 1990b). En la Argentina no es común la cría mixta de caprinos y ovinos; circunstancia por la cual la brucelosis causada por *B. melitensis* en ovinos, aunque existe, no se considera un problema importante (García-Carrillo, 1987; Samartino, 2002).

La brucelosis ovina, también denominada epididimitis infecciosa o contagiosa del carnero, causada por *B. ovis*, es una enfermedad infectocontagiosa, clínica o subclínica (OIE, 2004a), de curso crónico, que afecta en condiciones naturales al ovino (Blasco, 1983) y al ciervo (Ridler y col., 2002). Se caracteriza por producir en el carnero: infertilidad (OIE, 2004a), epididimitis crónica, vesiculitis seminal, anormalidades espermáticas (Lawrence, 1961; Foster y col., 1988; Alton y col., 1988) y orquitis secundaria (Robles, 1998). En las ovejas interfiere en la preñez y en la retención del feto, produciendo fallas reproductivas, abortos esporádicos, muerte embrionaria y muerte neonatal (McFarlane y col, 1952; Ris, 1970; Blasco y Barberán, 1990).

La infección por *B. ovis* presenta distribución mundial y se encuentra en todos los países donde la producción ovina es importante (Blasco, 1990a), causando serios perjuicios económicos por caída en la fertilidad de la majada, aumento en el descarte de carneros, acortamiento de la vida reproductiva de los mismos, abortos y aumento de la mortalidad perinatal en las hembras, con la consiguiente disminución en los rendimientos de carne y lana por hectárea y restricciones en el comercio (Bulgin, 1990; Robles, 1998).

2. 2. La enfermedad en el Mundo

En 1952 McFarlane y col. en Nueva Zelanda aislaron, a partir de carneros afectados de epididimitis y de ovejas que abortaron, un microorganismo gram-negativo, que inoculado experimentalmente por vía intravenosa determinaba la aparición de lesiones genitales. En 1953 la enfermedad fue observada simultáneamente por Simmons y Hall en Australia y por Buddle y Boyes en Nueva Zelanda (Lawrence, 1961; Blasco, 1983). A partir de estos hallazgos la infección ha sido descrita en: Checoslovaquia, Sudáfrica, Rumania, Francia, España, Bulgaria, Hungría, Portugal, Rusia (Blasco, 1983; Corbel, 1997; OIE, 2004a) e Italia (Gaffuri y Garbarino, 1999).

En América fue informada por primera vez en 1956, en Estados Unidos por McGowan y Shultz (Lawrence, 1961), y luego en Perú, 1961; Argentina, 1962; Uruguay, 1966; Chile, 1968; Brasil, México y Canadá, 1984 (García-Carrillo, 1987; Arsenault y col., 2004; OIE, 2004a).

En la Argentina, Szyfres y Chappel en 1962 aislaron el agente causal de la enfermedad y Otrowski y col. (1963) estudiaron la fertilidad ovina en una zona de la provincia de Buenos Aires y encontraron que el 28,6% de los carneros no eran aptos para la reproducción. El 76,11% de los carneros descartados tenían reacción de fijación del complemento (FC) positiva (García-Carrillo, 1987). En la Patagonia fue aislada por primera vez en carneros de Tierra del Fuego por Cedro y col., en 1963 (Robles y col., 1993).

2. 3. Epidemiología

Esta enfermedad de distribución universal, varía de acuerdo a la región geográfica, condiciones ambientales, especie, raza, edad y sexo de los animales (Robles, 1998).

Cuando ingresa por primera vez a una región suele hacerlo con una alta incidencia (20% a 60% de carneros infectados y un 45% a 70%, de majadas afectadas) pero en regiones donde es endémica la incidencia tiende a ser menor (Bulgin, 1990; Robles, 1998).

Respecto a la susceptibilidad racial hay distintas opiniones. McGowan y Shultz (1956) y Van Rensburg y col. (1958) no encontraron diferencias entre las razas como la Suffolk, Hampshire, Merino, Karacul, Persas y Doper. Hadju (1962), reportó mayor prevalencia en razas Tsigai y Valachian que en Merino (30% y 14%, respectivamente). Blasco y Barberán (1990), informaron que la raza Merino se encontraba menos afectada que las razas inglesas y sus cruizas, en condiciones de explotación similares. Brown y col. (1973), mediante inoculación experimental obtuvieron mayor resistencia a la infección en carneros Rambouillet que en los de raza Targhee y Columbia. Aunque la resistencia genética pudiera ser importante, las diferencias de precocidad y actividad sexual entre razas, jugarían un rol importante en la susceptibilidad racial (Blasco y Barberán, 1990).

Los animales más sensibles a la infección, en condiciones naturales son los adultos con experiencia sexual previa, incrementándose la incidencia a medida que aumenta la edad (Blasco y Barberán, 1990). Méndez Náñez y col. (1999) encontraron corderos de cuatro meses de edad, seropositivos a las pruebas de inmunodifusión en gel de agar (IDGA) y enzima inmunoensayo indirecta (IELISA), para *B. ovis*; aunque en menor proporción que en adultos. La seropositividad en corderos puede explicarse por la transmisión a partir de las ovejas, o por compartir espacios con carneros de mayor edad, donde los más jóvenes son sometidos por dominancia. Según Robles (1994) la prevalencia de la enfermedad está más en relación con la actividad sexual que con la edad.

La hembra ovina es más resistente a la infección, que el carnero (Hartley y col., 1955; Muhammed y col., 1975; Kimberling y Schweitzer, 1989). Algunos autores sostienen que juega un papel importante en la difusión de la enfermedad (Homse y col., 1995), ya que puede trasmitirla a sus crías (Blasco, 1990b). Los abortos no son una característica constante, aunque la mortalidad perinatal es más elevada de lo normal (Blasco, 1983). Según Hartley y col. (1955), las hembras son incapaces de mantener la infección de una estación reproductiva a la otra, pero han sido citados casos de permanencia de la infección (Buddle, 1955). Paolicchi y col. (2000b) demostraron en hembras serológicamente positivas, que los títulos se mantuvieron por once meses (tiempo que duró el ensayo) inclusive en el 22% de los corderos nacidos de madres positivas; esto, según los autores alerta sobre la persistencia de la infección en la hembra y por ende sobre su importancia en la epidemiología de las majadas.

En la transmisión, el semen de carneros infectados es una importante vía de difusión (Burgess, 1982). Según Hartley y col. (1955) la excreción por semen puede durar dos años, mientras que Buddle (1956) estima que los carneros pueden secretar semen infectado por más de 4 años. La eliminación de bacterias por el semen es intermitente (Robles, 1998; Paolicchi, 2005) y se han hallado cultivos positivos hasta 80 semanas posteriores a la infección experimental (Paolicchi y col., 1991; Radostits y col., 1994). Según Buddle y Boyes (1953) la eliminación por orina también debe ser considerada, aunque la mayor tasa de contagio ocurriría por la vía venérea pasiva durante el servicio, a través de la oveja (OIE, 2004a). En condiciones naturales una misma oveja suele ser repetidamente cubierta por varios carneros, lo que facilita la diseminación de la infección (Blasco y Barberán, 1990). La transmisión directa de carnero a carnero a través de la actividad homosexual, fuera de la época de servicio, sería la segunda forma de transmisión de la enfermedad (Buddle, 1955; Hartley y col., 1955; Biberstein y col., 1964; Brown y col., 1973; Burgess, 1982), ya que se establecen jerarquías en las que los carneros dominantes sodomizan con frecuencia a los sometidos, pudiendo transmitir *B. ovís* a través de la mucosa rectal u oral. Los carneros lamen el prepucio unos a otros y teniendo en cuenta que los animales infectados excretan millones de bacterias por el semen, el riesgo de contagio es elevado (Blasco y Barberán, 1990). La mayoría de las infecciones de carnero a carnero son transmitidas por vía oral (OIE, 2004a). El microorganismo puede ingresar por las mucosas peneana, prepucial, rectal, nasal (Burgess, 1982) y oral (Blasco y Barberán, 1990).

La infección de ovejas apareadas con carneros infectados es poco frecuente (Lawrence, 1961). En condiciones naturales la transmisión por vía intravaginal es la más común (Rahaley, 1982). Buddle (1955), demostró la infección en dos ovejas sobre veinticinco, servidas con cinco carneros infectados; dichas ovejas presentaron serología positiva y muerte de las crías. La infección congénita puede ocurrir en un bajo porcentaje de corderos (Hughes, 1972a; Watson, 1979). Las ovejas infectadas pueden excretar *B. ovís* por descargas vaginales y por la leche, de modo que tanto la transmisión de oveja a carnero como la de oveja en lactancia a cordero, deben ser considerados como mecanismos de infección (OIE, 2004a).

En ovinos la infección experimental se ha realizado por diversas vías de inoculación del microorganismo: oral (Simmons y Hall, 1953); endovenosa (Brown y col., 1973); nasal (Plant y col., 1986); escarificación de la mucosa vaginal (Muhammed y col., 1975); conjuntival (Direnko y Rudenko, 1976); intratesticular (Buddle y Boyes, 1953); colocando una suspensión de gérmenes en la mucosa prepucial y manteniendo el prepucio cerrado por cinco minutos (Webb y col., 1980) y rectal (Plant y col., 1986). Aunque los mejores resultados se obtuvieron utilizando las vías conjuntival y prepucial simultáneamente, con una dosis de 10^8 y 10^9 microorganismos (Marín y col., 1990).

También se logró infectar en forma experimental a caprinos (García-Carrillo y col., 1977) y a vacas preñadas. Estas últimas fueron inoculadas por vía endovenosa y se aisló *B. ovis* de leche (Buddle y Boyes, 1953). Solo se han reportado casos de infección natural, en ciervos (Ridler y col., 2002).

En animales de laboratorio la inoculación experimental ha transmitido la infección a cobayos, conejos, ratones (Buddle y Boyes, 1953), ratas (Kennedy y col., 1956) y jerbo (*Meriones unguiculatus*) (Cuba-Caparo y Myers, 1973). En ninguna de estas especies se han reportado casos de infección natural (Robles, 1998).

Es importante destacar que la probabilidad de que los animales se infecten depende en gran medida de la vía de entrada y de la concentración del inóculo (Blasco y Barberán, 1990).

B. ovis no ha sido informada hasta la fecha como causa de enfermedad en el hombre (Alton y col., 1988; Hoover y Friedlander, 1997; Orduña y col., 2001a; OIE, 2004a), aunque se han hallado reacciones serológicas positivas (Gavrilov y col., 1972; Meyer, 1982). Al presente nos encontramos evaluando serológicamente a personas estrechamente vinculadas a la producción ovina, utilizando pruebas con antígenos L y R.

La supervivencia de *Brucella* en el medio ambiente depende de factores tales como la temperatura, humedad y presencia de materia orgánica (Crespo León, 1994). Las bajas temperaturas y la alta humedad favorecen la supervivencia. Hay autores que consideran que la sobrevivencia de *Brucella* en el medio externo es reducida (Gorvel y Moreno, 2002), pero otros opinan que ante determinadas circunstancias puede mantenerse por un lapso importante. Si bien el sol directo la mata en horas, la bacteria localizada dentro de la materia orgánica puede perdurar bastante tiempo (Samartino, 2006).

B. ovis puede ser eliminada al ambiente por orina de animales infectados (Buddle y Boyes, 1953) y contaminar el suelo (Haughey y Hughes, 1969). También puede llegar al ambiente por descargas vaginales, fetos abortados y placenta (Hughes, 1972b).

2. 4. Patogénesis

Las especies de *Brucella* replican tanto en las células fagocíticas profesionales como no profesionales; son patógenas intracelulares facultativas (Gorvel y Moreno, 2002), propiedad que las mantiene protegidas de la acción de los antibióticos y de los mecanismos efectores dependientes de anticuerpos; esto justifica la naturaleza crónica de la infección, ya que son capaces de adherirse, penetrar y multiplicarse en una gran variedad de células eucariotas (Castro y col., 2005).

La supervivencia de *Brucella* dentro de las células se ha asociado con la síntesis de enzimas antioxidantes (Teixeira-Gomes y col., 2000) y a la producción de guanósina 5'-monofosfato (GMP) y adenina, que inhiben la fusión fagosoma-lisosoma, la degranulación, la activación del sistema haluro-mielo-peroxidasa y la producción del factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α) (Canning y col., 1986).

Se ha observado que las cepas rugosas, resultan más susceptibles a la muerte intracelular. Así, entre 7-10 horas después de la invasión, el recuento de bacterias intracelulares de fenotipo liso cae en un 90% y en un 99% para las bacterias de fenotipo rugoso (Comerci y col., 2001; Boschirolí y col., 2002).

La patogénesis de la infección puede ser dividida en dos tipos básicos: descendente o hematógena (tras la penetración de *B. ovis* por cualquier vía, a excepción de la genital) y la ascendente o venérea (Hardefeldt, 1977; Jansen; 1980; Homse y col., 1994).

En los carneros, *B. ovis* penetra en los tejidos, e independientemente de la vía de entrada es transportada por linfa, libre o en el interior de las células fagocíticas, hasta alcanzar los ganglios linfáticos regionales. Si las bacterias no son destruidas se difunden por vía hematógena a todo el organismo, principalmente tracto genital, hígado, bazo, pulmones, riñones y ganglios linfáticos (Biberstein, y

col., 1964). En dichos órganos pueden sobrevivir y multiplicarse dentro de las vacuolas de los fagocitos circulantes y tisulares (Pizarro-Cerda y col., 1998).

Las brucelas producen inflamaciones crónicas de carácter granulomatoso en los órganos que parasitan (Blasco, 2001).

Existe un período de latencia de dos a ocho semanas antes de que aparezcan signos clínicos. En condiciones experimentales *B. ovis* permanece dos o tres semanas en los ganglios linfáticos próximos al lugar de inoculación antes de que la infección se disemine por vía sanguínea (Blasco y Barberán, 1990).

Luego de aproximadamente sesenta días post exposición *B. ovis* desaparece de los ganglios linfáticos y otros órganos, y se localiza en órganos del sistema reticuloendotelial, epidídimo, vesículas seminales, glándulas bulbouretrales, ampollas de los conductos deferentes y a veces en riñón (Biberstein y col., 1964; Bulgin, 1990; Robles, 1998), siendo la vía más importante de eliminación la seminal (Harthey y col., 1955; Blasco y Barberán, 1990), y ocasionalmente la urinaria (Bulgin, 1990).

Gaffuri y Garbarino (1999) en cultivos realizados a partir de material necropsiado aislaron *B. ovis* de epidídimos en 63,15%, de orina en 58,80%, glándulas bulbouretrales 15,60%, vesículas seminales 25%, riñones 18,75% y bazo 20%. El alto porcentaje de microorganismos encontrado en orina puede indicar que ésta es una vía importante de eliminación (Gaffuri y Garbarino, 1999).

Es frecuente que los carneros con títulos serológicos positivos que excretan *B. ovis* en el semen, con alto contenido de células inflamatorias, no desarrollen lesiones detectables clínicamente por un período prolongado post infección (Paolicchi y col., 1990).

No se conoce bien la razón por la cual la bacteria coloniza preferentemente el tejido epididimario, pero se ha asignado importancia a la anatomía de los vasos sanguíneos y a una marcada adhesividad que poseen las brucelas rugosas a la superficie celular (Detilleux y col., 1990). La liberación de bacterias desde células fagocíticas y en contacto con los tejidos, provoca una fuerte respuesta serológica y celular, con el desarrollo de lesiones severas que conducen a la formación de granulomas espermáticos (Paolicchi, 2001). En primer lugar se produce una exudación serofibrinosa, acumulo de linfocitos en áreas perivasculares y de células plasmáticas, con desarrollo de hiperplasia del endotelio capilar. Luego aparecen neutrófilos, especialmente donde se está produciendo espermotasia.

El conducto epididimario presenta células desorganizadas, vacuolización epitelial y comienzan a observarse linfocitos intraepiteliales. Algunas regiones culminan con la formación de áreas hiperplásicas mayores que determinan los quistes intraepiteliales, que contienen neutrófilos y bacterias en su interior. Por último se produce la ruptura del túbulo epididimario, poniendo en contacto a los espermatozoides (considerados antígenos propios) con células inflamatorias y desencadenando una respuesta antiespermática con un granuloma de sensibilización.

Las lesiones microscópicas en las vesículas seminales y ampollas de los conductos deferentes son: infiltración de macrófagos, linfocitos, células plasmáticas y neutrófilos, dentro del estroma y epitelio (Plant y col., 1986; Foster y col., 1987), acompañados por procesos de fibrosis e hiperplasia epitelial (Blasco y col., 1987).

No hay orquitis primaria, pero sí degeneración testicular secundaria con éstasis en túbulos seminíferos (por obstrucción del epidídimo), edema, infiltración linfocitaria, hemorragias focales, destrucción del epitelio germinal, calcificación, granulomas espermáticos, (generalmente microscópicos) y fibrosis (Kennedy y col., 1956; Komissarova, 1973; Shergin y col., 1974; Plant y col., 1986; Paolicchi y col., 1991). Los granulomas espermáticos están conformados por un núcleo de espermatozoides extravasados, rodeados por células epiteloides, células gigantes y linfocitos. Comúnmente alrededor del granuloma se desarrolla un proceso activo de fibrosis (Kennedy y col., 1956; Blasco, 1990a).

Las glándulas bulbouretrales no presentan lesiones (Badiola y col., 1981).

Los carneros infectados con *B. ovis*, pueden presentar una disminución del volumen de eyaculado y del número de espermatozoides, aumento de espermatozoides anormales y de células inflamatorias, disminución de la motilidad e incluso pueden llegar a la azoospermia. Las lesiones en los espermatozoides aparecen en la cola y en la cabeza: separación del acrosoma, hinchazón de la membrana nuclear, debilidad de la unión entre cabeza y cuerpo (Cameron y col., 1971; Cameron y Lauerman, 1976; Bakurdjiev y Krustev, 1976, 1977; Folch y col., 1981; Bulgin, 1990). Las anomalías espermáticas pueden aparecer de una a seis semanas luego del inicio de la infección (Burgess, 1982).

Las primeras lesiones aparecen en la cola del epidídimo y en la mayoría de los casos es unilateral. Los hallazgos macroscópicos consisten en aumento del

tamaño de la cola del epidídimo afectado hasta tres o cuatro veces su tamaño normal y consistencia muy dura. La superficie de sección es blanca y puede contener uno o varios granulomas espermáticos ocupados por una sustancia cremosa y caseosa (Blasco y Barberán, 1990). Pueden observarse adherencias entre el epidídimo, el testículo y la túnica vaginal (Simmons y Hall, 1953; Buddle, 1956; Kennedy y col., 1956; Méndez Náñez y col., 1999). En algunas ocasiones también están afectados el cuerpo y la cabeza del epidídimo, pero estas alteraciones siempre van precedidas de la lesión de la cola (Biberstein y col., 1964). En un estudio realizado por Giauffret y col. (1972) el examen post mórten de las bolsas escrotales demostró que el 29% de los cuerpos de los epidídimos estaban afectados, mientras que solo un 4% había sido diagnosticado por palpación ante mórten.

Los cambios en los testículos son siempre secundarios a los de epidídimos. La atrofia testicular es el hallazgo más común, pudiendo observarse calcificaciones (Buddle, 1956; Kennedy y col., 1956; Biberstein y col., 1964; Plant y col., 1986). También ha sido descrita la presencia de hidroceles (Shortridge, 1962; Robles y col., 1993). No suelen apreciarse alteraciones macroscópicas en las glándulas sexuales accesorias (Blasco y Barberán, 1990). Los ganglios linfáticos ilíacos pueden aparecer hipertrofiados y edematosos (Blasco, 1983). También han sido observadas lesiones en órganos extragenitales como bazo, hígado, y ganglios, en casos de infección hematógena (Shortridge, 1962).

En las ovejas, como en otras especies, *Brucella* tiene una marcada predilección por la placenta, y la multiplicación ha sido observada en el interior de los trofoblastos coriónicos de placentas infectadas. Dicha multiplicación se produce en el retículo endoplásmico rugoso (RER). Esto se puede deber a que la bacteria aprovecha la actividad del RER para la síntesis y glicosilación de las proteínas bacterianas (Anderson y Cheville, 1986; Anderson y col., 1986).

En hembras, Gaffuri y Garbarino (1999) aislaron *B. ovis* de animales necropsiados de los siguientes órganos: placenta 12,5%, linfonódulos (ilíacos y supramamarios) 10%, útero 6,89% y abomaso 10%; no se aisló de orina y riñones. Homse y col. (1994) inocularon ovejas en el momento del servicio y aislaron *B. ovis* de cervix, útero, linfonódulos y bazo, entre los 15 y 45 días luego de la inoculación. Se puede observar que en ambos trabajos no se aisló de glándula mamaria.

En las hembras que entran en contacto con *B. ovis* por primera vez, se observa una cervico-vaginitis mucopurulenta transitoria, salpingitis y endometritis, que pueden originar reabsorción fetal y/o esterilidad (Giauffret y col., 1972). Las ovejas inseminadas e inoculadas con *B. ovis* por vía intracervical desarrollan vaginocervicitis y endometritis con extensión al corion subyacente de tipo catarral o mucopurulenta. La recuperación de *B. ovis* a partir de vagina y mucus cervical demuestra una tendencia inversa a la evolución de la enfermedad. A medida que progresa disminuyen los aislamientos a partir de tejidos genitales superficiales, incrementándose la recuperación de la bacteria de órganos profundos (linfonódulos y bazo) (Homse y col., 1994). La inoculación experimental en hembras gestantes sólo provoca abortos en una pequeña proporción de animales (Meinershagen y col., 1974). En estos casos la lesión observada con más frecuencia es placentitis, localizada preferentemente en la región intercotiledonaria, con placas coalescentes y un exudado denso de color gris amarillento. Algunos cotiledones presentan zonas de necrosis y la placenta puede estar parcialmente separada del útero y unida solo por algunas carúnculas. Las lesiones microscópicas suelen consistir en infiltrados de neutrófilos y macrófagos en el tejido intercotiledonario y trombosis de los vasos sanguíneos. En el endometrio los infiltrados celulares y la necrosis son las lesiones más frecuentes (Blasco y Barberán, 1990).

En estadíos avanzados de la infección hay alteraciones en la circulación sanguínea materno-filial (Blasco, 2001). Se produce una vasculitis placentaria, con separación de los trofoblastos placentarios y el epitelio sincitial materno. Estos procesos patológicos terminan causando placentitis y evidente dificultad para nutrir correctamente al feto, el que suele llegar a término y nacer vivo, pero liviano y de poca resistencia, por lo que estas ovejas suelen tener mayor mortalidad perinatal o no logran destetar corderos pesados, o bien provocan la muerte del feto y el aborto (Anderson y col., 1986; Meador y col., 1988).

Los fetos abortados aparecen edematosos, siendo características las placas calcificadas en las pezuñas y dedos accesorios. Pueden presentar neumonía y linfadenitis. Los ganglios linfáticos tienen desarrollo de centros germinales y presencia de células plasmáticas en ganglios y bazo. También puede haber nefritis intersticial aguda (Blasco, 1983), neumonía supurativa y lesiones en hígado (Libal, 1990).

En la oveja vacía, luego de la exposición, se produce una inflamación de cérvix y vagina que dura 24 a 48 h y desaparece, aunque puede reaparecer en otro servicio infectado, y estas ovejas pueden tener menor fertilidad que las no expuestas a la infección (Hughes, 1972a).

2. 5. Diagnóstico Clínico

La manifestación clínica más importante en los carneros es la epididimitis con la consiguiente disminución de la fertilidad (Blasco y Barberán, 1990). Los síntomas iniciales generalmente pasan desapercibidos (Robles, 1998). Los animales pueden desarrollar hipertermia (41,7 °C), disnea, mal estado general, anorexia e inflamación del escroto (Buddle, 1956; Shergin y Vozhdaev, 1974). La libido puede estar disminuida en esta etapa (Blasco, 1983).

Es importante destacar que *B. ovis* no es la única causa de alteraciones genitales en los carneros. El diagnóstico clínico es sumamente inespecífico (OIE, 2004a), y se debe establecer el diagnóstico diferencial con traumatismos y otros agentes etiológicos, no específicos y específicos, que pueden ocasionar epididimitis (ver páginas 20 y 21).

En el caso de *B. ovis*, las primeras lesiones palpables en los epidídimos aparecen entre la segunda y octava semana posteriores a la inoculación (Biberstein y col., 1964; Jones y col., 1975; Cameron y Lauerman, 1976; Webb y col., 1980; Bulgin, 1990). Cerri y col. (1999) demostraron en carneros sexualmente inmaduros e inoculados en forma experimental que aparecieron lesiones macro y microscópicas en epidídimos entre las semanas once y trece pos-inoculación y pudieron aislar el microorganismo de dicho órgano. Quizás la diferencia en el tiempo de aparición de las lesiones se deba a las distintas vías de inoculación utilizadas. A la palpación, uno o ambos epidídimos aparecen aumentados de tamaño e indurados, generalmente en la región de la cola, aunque también pueden apreciarse alteraciones en la cabeza. Las alteraciones en el cuerpo del epidídimo, aunque existan, son raramente percibidas a la palpación (Giauffret y Sanchis, 1974). En la etapa crónica de la infección la libido se encuentra normal (Bulgin, 1990).

El equilibrio de *Brucella* sp. con su hospedador habitual explicaría fenómenos biológicos como la resistencia de algunos animales a la enfermedad, su carácter autolimitante en otros y el estado de enfermedad latente (Crespo León, 1994).

La infección natural por *B. ovis* en ovejas presenta un carácter esporádico y puede manifestarse por abortos en el último tercio de gestación y reabsorción embrionaria (Buddle, 1956; Hughes y Claxton, 1968; Muhammed y col., 1975), con repetición de celo y aumento de la cola de parición. La mayoría de los corderos nacen vivos, aunque pueden aparecer fetos momificados (Blasco, 1983). Se ha observado un aumento de la mortalidad perinatal o nacimiento de crías débiles, con peso inferior al normal (Hughes, 1972a; Zamora y col., 1977; Beherens, 1979; McGowan, 1979).

Los abortos no son una característica constante de esta infección (McGowan y Schultz, 1956). En un grupo de hembras inoculadas con *B. ovis* por vía intravaginal en el día del servicio se produjo un incremento en la repetición de celos, ocurriendo pérdidas embrionarias entre el día veintiuno y veinticinco de gestación (Hughes, 1972b).

En ovejas inseminadas, que fueron infectadas con *B. ovis* por inoculación, el porcentaje de pérdidas embrionarias alcanzó el 20%, y la eliminación de *Brucella* a través de la excreción vaginal continuó durante sesenta días pos-infección (Paolicchi, 2005).

Grillo y col. (1999) infectaron ovejas por vía conjuntival en la mitad de la gestación y encontraron que algunas excretaban bacterias por secreciones vaginales y leche. Al año siguiente las ovejas fueron servidas nuevamente con carneros sanos y aunque permanecieron infectadas, excretando *B. ovis* por leche, ningún cordero ni carnero utilizado para el segundo servicio se halló infectado al momento de la necropsia.

En carneros el diagnóstico clínico se efectúa por palpación del contenido escrotal (Van Tonder, 1977; Blasco, 1983; Robles, 1989). Cuando existen alteraciones, la región de la cola del epidídimo es la más afectada (Walt, 1972). La epididimitis en la mayoría de los animales se focaliza en la cola del epidídimo que presenta un aumento de tamaño tres o cuatro veces superior al normal y consistencia muy dura, involucrando un solo epidídimo en la mayoría de los casos (Blasco, 1983), aunque puede ser bilateral (Cameron y Lauerman, 1976; Badiola y col., 1981). En segundo lugar pueden ocurrir anomalías testiculares, caracterizadas por atrofia y

pérdida de tono. También es posible encontrar aumento de tamaño de los ganglios linfáticos inguinales (Blasco, 1983; Robles, 1993). Como ya se explicó la frecuencia de las lesiones aumenta con la edad, esto tiene importancia clínica epidemiológica y debería ser considerado en programas de control y erradicación de la enfermedad (Bonino y Cavestany, 2005).

Algunos animales infectados pueden pasar desapercibidos, debido a que no presentan alteraciones detectables por palpación (Biberstein y McGowan, 1958; Hughes y Claxton, 1968; Giauffret y col., 1972, Jones y col., 1975; Webb y col., 1980) aunque existe excreción seminal de bacterias (Blasco y Barberán, 1990). Según Blasco y Jiménez de Bagués, (1990) sólo el 50% de los animales infectados por *B. ovis* presentan alteraciones testiculares detectables por palpación. Robles y col., (1993) encontraron que el 20% de los carneros serológicamente positivos, tenían alguna lesión en el aparato reproductor. Esto alerta sobre el valor relativo que tiene la revisión clínica como práctica aislada para controlar la brucelosis en los carneros y refuerza la conveniencia de usar esta técnica en combinación con la serología específica (Van Tonder, 1977; Robles y col., 1993). Si bien es una práctica económica y fácil de realizar los resultados no son concluyentes, ya que hay otras causas, mencionadas en las páginas 20 y 21, que pueden producir epididimitis palpables.

En el caso de las hembras, la clínica no aporta datos significativos porque los abortos son esporádicos y difíciles de visualizar. En forma indirecta, a través de los bajos índices reproductivos (porcentajes de no retorno al celo, de señalada, y de destete) se puede sospechar algún trastorno, pero se debe efectuar el diagnóstico diferencial (ver página 21).

2. 6. Diagnóstico bacteriológico

El aislamiento del agente causal es el único método certero en el diagnóstico de brucelosis (Blasco y Marín, 1990; Lucero, 1996; Robles, 1998). En animales vivos, para el aislamiento de *B. ovis* las muestras más recomendables son: semen recogido en forma estéril con electroeyaculador (Blasco y Marín, 1990; OIE, 2004a) o hisopado de cavidad prepucial, tomado luego de la monta natural (Blasco y Marín, 1990).

B. ovis se excreta por semen en forma intermitente (Webb y col., 1980), por lo que se recomienda tomar tres o cuatro muestras, con una semana de intervalo (Walt, 1972; Brown y col., 1973). En las ovejas abortadas las muestras más recomendables son las obtenidas por hisopado vaginal. En hembras sin abortar se puede intentar a partir del mucus cervico vaginal, utilizando para ello una pipeta de inseminación artificial de bovinos, mediante la cual se introduce solución fisiológica estéril y se recupera material del fondo de vagina. También se puede efectuar el aislamiento a partir de leche (Blasco y Marín, 1990; OIE, 2004a). En el caso de contar con material abortado las muestras adecuadas son: placenta, hígado, bazo, pulmón y contenido gástrico del feto (Blasco y Marín, 1990; OIE, 2004a).

En necropsias de carneros se recomienda el aislamiento a partir de: epidídimos, vesículas seminales, ampollas de conducto deferente, ganglios ilíacos (Blasco y Marín, 1990; OIE, 2004a) y bazo (Blasco y Marín, 1990). En ovejas las muestras indicadas son: útero y ganglios linfáticos ilíacos y supramamarios (OIE, 2004a). En todos los casos es necesario trabajar respetando las medidas de bioseguridad recomendadas para gérmenes de nivel de riesgo 3 (WHO, 2004).

Según Blasco y Marín (1990), el material para el aislamiento de *B. melitensis* pueden congelarse sin problemas de viabilidad; sin embargo para el aislamiento de *B. ovis*, lo más recomendable es que la siembra se realice lo antes posible. Las muestras pueden permanecer viables por varias horas a temperatura ambiente, aunque el tiempo de supervivencia aumenta manteniéndolas a 4°C (OIE, 2004a).

Se puede realizar el diagnóstico presuntivo rápido examinando microscópicamente frotis de semen, mucus cervico vaginal o tejidos, siguiendo los procedimientos descritos en páginas 25 y 26.

Es posible confundir *B. ovis* con otros microorganismos como *B. melitensis*, *Coxiella burnetti* y *Chlamydophila abortus* (Lozano, 1986; OIE, 2004a), por lo cual los resultados microscópicos siempre deben confirmarse por cultivo del microorganismo (OIE, 2004a). La coloración de Giemsa puede ser usada para detectar células inflamatorias en semen, indicadoras de infección en el tracto genital, pero no para determinar el agente causal (Webb y col., 1980; Burgess y Norris, 1982).

Los medios de cultivo sólidos son los más indicados para los aislamientos, porque permiten la observación de la morfología de las colonias. Los más comunes, como agar-suero-dextrosa (ASD) (Lucero, 1996), agar-sangre y agar-tripticasa-soya, pueden ser utilizados, pero adicionando 3%-5% de sangre o suero (Blasco y Marín, 1990; OIE, 2004a). Estos medios de cultivo no se recomiendan para el aislamiento primario, por la contaminación con bacterias de crecimiento rápido que suelen tener las muestras que impiden el desarrollo de *B. ovis* (Alton y col., 1988; Blasco y Marín, 1990). Habitualmente se prefieren medios selectivos como el de Thayer y Martin modificado (Alton y col., 1988; Blasco y Marín, 1990; OIE, 2004a) y el de Skirrow modificado (Terzolo y col., 1991).

Semen, leche y exudado vaginal pueden ser cultivados directamente en el medio de cultivo adecuado (OIE, 2004a). No obstante en el caso de la leche se consigue máxima sensibilidad centrifugando las muestras en tubos cerrados a 2000 x g durante quince minutos y sembrando crema y sedimento por separado (Verger, 1986; Blasco y Marín, 1990; OIE, 2000). Las muestras de tejidos conviene macerarlas con pequeñas cantidades de solución salina estéril tamponada a pH 7 previo al cultivo (OIE, 2004a).

Las colonias de *B. ovis* en aislamiento primario sembradas en medios selectivos, no suelen ser visibles hasta después de 48-72 h de incubación que es cuando alcanzan un tamaño de 0,5-2,5 mm, haciéndose perfectamente visibles a los cinco días (Blasco y Marín, 1990). No se debe descartar un cultivo como negativo hasta pasados los 7 días (OIE, 2004a) y según Alton y col., (1988) hasta pasados los 8 a 10 días.

Las colonias observadas en forma directa con luz reflejada a 45°, presentan un aspecto rugoso. La confirmación de la observación directa se realiza mediante el uso de acriflavina, colorante que autoaglutina las colonias rugosas (OIE, 2004a).

Las colonias rugosas tienen apariencia granular, de color amarillento o amarillo grisáceo y las mucoides son transparentes y tienen consistencia mucosa. Las colonias en fase rugosa (R), son viscosas y difíciles de desprender de la superficie del agar; no forman suspensiones uniformes en solución salina, aunque sí agregados granulares (Alton y col., 1988).

Si se inundan las placas con solución de cristal violeta y oxalato de amonio, las colonias rugosas y mucoides se tiñen con tonalidades variables de rojo y púrpura, total o parcialmente (Blasco y Marín, 1990).

En el medio de Farrel las colonias son traslúcidas, aunque con el tiempo toman color miel. En el medio de Thayer-Martin son blanquecinas y abombadas (Blasco y Marín, 1990).

B. ovis carece de actividad ureásica, no reduce nitratos a nitritos, es catalasa positiva y oxidasa negativa, no produce anhídrido sulfuroso (SH₂) y aunque no crece en presencia de violeta de metilo, usualmente lo hace en concentraciones estándar de fuscina básica y tionina (OIE, 2004a). Aglutina con suero monoespecífico anti-R y no lo hace con los sueros anti-M o anti-A, dirigidos contra los antígenos de *Brucella* en fase lisa (Alton y col., 1988).

Los cultivos de *B. ovis* no son lisados por los fagos Tbilisi (Tb), Weybridge (Wb) e Izatnagar (Iz), aunque son sensibles al fago R/C (Corbel y col., 1978; Alton y col., 1988).

B. ovis puede ser identificada primariamente en base a las características de crecimiento, observación directa de las colonias con luz reflejada en forma oblicua, coloración de Gram o Stamp, las pruebas de catalasa, oxidasa, ureasa y de acriflavina. Sin embargo la confirmación definitiva requiere de un laboratorio con experiencia en la identificación y tipificación de *Brucella* (OIE, 2004a).

El desarrollo de técnicas de amplificación genómica y su aplicación al diagnóstico e identificación microbiana aportan nuevas herramientas al diagnóstico (Orduña y col., 2001c).

Se ha informado una PCR, cuya sensibilidad sería similar al cultivo de semen de carneros y podría ser utilizada como prueba complementaria para el diagnóstico directo de *B. ovis* (Manterola y col., 2003) y un método de electroforesis en campo pulsado que permitiría diferenciar *B. ovis* de otras especies de *Brucella* (Michaux-Charachon y col., 1997). También se ha descrito una prueba de coagulación con látex para la identificación rápida de colonias rugosas de *Brucella* (Bowden y col., 1997).

La prueba de inmunofluorescencia directa en improntas presenta elevada inespecificidad (Blasco y Marín, 1990) y la peroxidasa antiperoxidasa en cortes histológicos (Foster y col., 1988) necesita mayor desarrollo para mejorar la sensibilidad (Robles, 1998).

2. 7. Estructura Antigénica

Los antígenos de *Brucella* han sido estudiados por su interés para el diagnóstico y para la inmunoprofilaxis.

La estructura más característica de las bacterias gram-negativas es su envoltura celular, formada por una membrana citoplasmática, una capa de peptidoglicano, un espacio periplasmático intermedio, rico en proteínas solubles y una membrana externa (Moriyón y col., 2001). Esta última constituye, sin duda, la estructura de mayor interés desde el punto de vista taxonómico, epizootiológico, antigénico, inmunológico, de diagnóstico y patogénico, todo ello en razón de su particular composición química y estructura antigénica. Dicha membrana, al estar desprovista de cápsula, se encuentra en contacto directo con el medio, y contiene en su superficie los componentes antigénicos más importantes (antígenos de superficie) (Crespo León, 1994).

La membrana citoplasmática consta de una bicapa lipídica compuesta por fosfolípidos, con ácidos grasos formando unidades hidrofóbicas y gliceroles como unidades hidrofílicas. Luego, la pared rígida de peptidoglicano, formada por dos derivados de azúcares: N-acetil-glucosamina y N-acetil murámico (Ramis, 2000), responsables de la forma e integridad osmótica de la bacteria. El espacio periplasmático contiene enzimas, algunas de las cuales detoxifican agentes nocivos procedentes del medio, proteínas relacionadas con el transporte de nutrientes y enzimas sobre las que actúan los antibióticos β -lactámicos. La membrana externa (ME), separada de la pared de peptidoglicano por el espacio periplasmático, es la barrera entre la bacteria y el medio ambiente y la primera en entrar en contacto con el sistema inmune del reservorio (Lucero 1996). Contiene distribuidos asimétricamente, fosfolípidos, proteínas y un LPS. La simetría en la distribución del LPS, junto con sus propiedades y las de las proteínas que actúan como poros en la membrana externa (porinas), hace que actúe como una barrera de permeabilidad frente a muchos solutos hidrofílicos e hidrofóbicos (Moriyón y col., 2001).

La envoltura celular del género *Brucella* presenta algunas diferencias con la membrana externa de otros gram-negativos (enterobacterias y pseudomonas). Es relativamente permeable a agentes hidrófobos como colorantes, detergentes y sales biliares, con diferencias entre especies y biotipos. Es resistente a los

péptidos catiónicos bactericidas presentes en lisosomas y fluidos corporales y a otros policationes bactericidas como la polimixina B. Estas características se relacionan con ciertas propiedades de los componentes de la membrana externa. La envoltura de *Brucella* contiene entre otros fosfolípidos, fosfatidil-colina, lo que es poco común en patógenos gram-negativos, y lípidos de ornitina. Los fosfolípidos y el LPS poseen ácidos grasos de cadena más larga que lo habitual en los gram-negativos típicos. Es posible que estas características se relacionen con la tinción positiva de las brucelas por el método de Stamp (ácido alcohol resistentes modificado) (Moriyón y col., 2001).

El LPS consta de una parte glucolípida (lípidos A), inserta en la membrana externa y por tanto no expuesta en la superficie, y otra polisacárida dirigida hacia el exterior. Esta última se divide en dos secciones: el núcleo y la cadena O. Las especies *B. ovis* y *B. canis* (especies rugosas) carecen de cadena O y otras que característicamente la poseen, *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* y *B. neotomae*, (especies lisas), pueden perderla por mutación (mutantes rugosas o R) (Moriyón y col., 2001). Sin embargo, el LPS-R de las mutantes rugosas y de *B. ovis* muestran sólo identidad parcial (Moriyón y Gamazo, 1990). La presencia de LPS-R, naturales o por mutación, hace que existan dos tipos diferentes de superficies celulares. Esta diferencia es importante, ya que las brucelas habitualmente patógenas para el hombre poseen LPS en fase lisa y éste es marcadamente inmunodominante en la respuesta serológica (Moriyón y col., 2001).

El lípidos A de *Brucella* está formado por un disacárido de diaminoglucosa sustituido con β -hidroxiácidos y otros ácidos grasos de cadena larga. Como antígeno, el lípidos A no parece tener relevancia diagnóstica (Moriyón y col., 2001). No se conoce en detalle la estructura del núcleo del LPS, si bien se sabe que contiene 2-ceto, 3-desoxioctonato (KDO), glucosa, galactosa y quinovosamina, por la cual se une la cadena O. Las cepas rugosas carecen de quinovosamina y por lo tanto de dicha cadena (Blasco y Gamazo, 1994). El núcleo no posee heptosas ni fosfatos. Con anticuerpos monoclonales se han descrito dos epitopes en el núcleo (Moriyón y col., 2001).

Además de la cadena O del LPS, las brucelas en fase lisa (L) contienen un segundo polisacárido, habitualmente llamado hapteno nativo. Salvo en la unión al núcleo del LPS, el hapteno nativo es químicamente idéntico a la cadena O (en la mutante rugosa *B. melitensis* 115 existe el polisacárido B, químicamente

equivalente al hapteno nativo). El hapteno nativo podría representar una molécula de superficie que, inserta entre los LPS-S, contribuiría a dar a la superficie características de tipo L sin incrementar la densidad de LPS y sus secciones internas (Moriyón y col., 2001).

En la ME de *B. ovis* se encuentran dos grupos de antígenos mayores: el LPS-R y las proteínas de membrana externa (PME). Ambos están expuestos en la superficie de la ME, presentando epitopes accesibles a los anticuerpos monoclonales, ya que no existe el impedimento estérico de la cadena O del LPS presente en las cepas lisas. Esto ha sido comprobado mediante distintas técnicas como: ELISA sobre células enteras, microscopía electrónica y citometría de flujo (Bowden y col., 1995a).

El LPS-R es una molécula compleja y de bajo peso molecular, compuesto por el lípido A y un núcleo o “core” constituido por oligosacáridos y KDO. Este último se encuentra en mayor proporción en *B. ovis* que en el resto de las especies de *Brucella* (Afzal y col., 1984). Aunque en el lípido A y en el “core” existen epitopes compartidos con cepas rugosas de otras brucelas, hay también epitopes específicos de *B. ovis* (Suárez y col., 1990) y otros comunes con especies de otros géneros pertenecientes a la subdivisión α -2 de la clase Proteobacterias (Velasco y col., 1997).

Existen varios datos que cuestionan la importancia del LPS de *Brucella* como determinante de patogenicidad. En primer lugar, la principal diferencia estructural entre el LPS de las cepas L y R radica en que el LPS de las cepas R carece de gran parte de la cadena polisacárido O. El resto de la molécula, el lípido A y el núcleo de KDO, es idéntico en los LPS de ambas cepas, L y R, y es preciso tener en cuenta que la mayor parte de las propiedades biológicas del LPS reside en el lípido A. En segundo lugar, *B. canis* y *B. ovis*, ambas R, son patógenas (Orduña y col., 2001b).

Las PME se asocian estrechamente con los LPS. Dentro de éstas se encuentran las proteínas mayores y menores, de acuerdo a su abundancia relativa. Las mayores se clasifican en tres grupos de acuerdo a sus pesos moleculares: grupo 1, de 88 a 94 kDa; posiblemente su función está relacionada con la biosíntesis de la propia envoltura (Moriyón y col., 2001); grupo 2, de 36 a 38 kDa, son equivalentes a las porinas de otros gram-negativos, formando en estado nativo agrupaciones triméricas por las que penetran ciertos solutos. Dos genes, *omp2a*

y *omp2b*, codifican estas porinas, pero solo el segundo parece expresarse *in vitro* (Moriyón y col., 2001); grupo 3, de 25 a 27 y de 31 a 34 kDa, las cuales están fuertemente asociadas al peptidoglicano (Cloekaert y col., 1992; 2002; Salhi y col., 2003) y se encuentran expuestas en la ME, pero son menos accesibles en las cepas lisas que en las rugosas, debido al impedimento estérico ocasionado por las cadenas O del LPS de las primeras. Las proteínas del grupo 3 son predominantes en *B. ovis* (Santos y col., 1984), codificadas en los genes *omp25* y *omp31*. Se han descrito interacciones muy fuertes con el LPS, pero su papel es desconocido (Moriyón y col., 2001). Los determinantes antigénicos más relevantes están expuestos en la superficie de las mutantes rugosas y de *B. ovis* (Moriyón y Gamazo, 1990).

El gen *omp25*, que codifica las proteínas de 25-27 kDa, en *B. ovis* presenta una única deleción que permite distinguirlo de las otras especies del género. En *B. ovis*, esta proteína presenta un peso molecular menor y una conformación diferente, la cual permitiría la exposición de epitopes discontinuos específicos en superficie (Cloekaert y col., 1996).

Mediante el empleo de anticuerpos monoclonales se han identificado otras proteínas de membrana menos abundantes que se denominan proteínas menores, siendo algunas de ellas lipoproteínas (Cloekaert y col., 1999). Son las proteínas de 10 kDa, 16,5 kDa, 19 kDa y 89 kDa. En las tres primeras se han encontrado marcadores específicos de *B. ovis* en las tres primeras, y se conocen los genes *omp 10*, *omp16* y *omp19*, respectivamente. La proteína de 19 kDa presenta en *B. ovis* una masa molecular aparente mayor que en el resto de las especies, aunque queda por investigar si esta diferencia tiene origen genético (Tibor y col., 1996). También se ha descrito una lipoproteína de peso molecular 8-9 kDa, unida covalentemente al peptidoglicano (Moriyón y col., 2001). Las proteínas citoplasmáticas no presentan diferencias marcadas entre las distintas especies de *Brucella* (Moriyón y col., 2001), son específicas del género y la mayoría compartidas por todas las especies (Baldi y col., 1994). Sin embargo no existen antígenos solubles comunes entre *Brucella* y otras bacterias gram-negativas, incluidas aquellas cuyo LPS-L presentan reacciones cruzadas (Díaz, 1974; Díaz y Bosseray, 1974). Las proteínas citosólicas inducen anticuerpos y también hipersensibilidad retardada, pero es muy probable que también lo hagan otras de distinta localización celular (Moriyón y col., 2001).

Existen otras proteínas, siendo las más relevantes desde el punto de vista antigénico las siguientes:

-Proteína 67 kDa: descrita en extractos de *B. ovis*; su papel como antígeno es importante, ya que se observa que un 85% de los animales infectados con *B. ovis* presentan anticuerpos frente a ella (Riezu-Boj y col., 1989).

-Grupos B, C y D: estos grupos con peso molecular de 21,5-22,5 kDa, 18,0-19,5 kDa y 13,0-15,5 kDa, respectivamente, han sido estudiados únicamente en *B. melitensis* y *B. ovis* (Gamazo y col., 1989; Riezu-Boj y col., 1989). Los animales infectados por estas especies de *Brucella* desarrollan anticuerpos frente a ellas (Riezu-Boj y col., 1989).

Existen pequeñas diferencias en los perfiles proteicos de la membrana externa de las distintas especies. La más característica afecta a las proporciones relativas de los grupos 2 y 3. Al contrario de lo que ocurre en *B. abortus* en la que los grupos 2 y 3 están presentes en cantidades iguales en los extractos obtenidos con detergentes, en *B. melitensis* y *B. ovis*, la relación grupo 3 / grupo 2 está muy aumentada (Santos y col., 1984). *B. abortus* tiene una gran delección en el gen que codifica la *omp31*, por lo que esta proteína está ausente. La mayoría de las proteínas citadas presentan epitopes en la superficie de *B. abortus* y *B. melitensis* pero su grado de exposición es menor que en las mutantes R o que en *B. ovis* (Moriyón y col., 2001).

No parecen existir diferencias antigénicas entre proteínas de la membrana externa de cepas de *B. ovis* de distinto origen geográfico y existen reacciones cruzadas entre proteínas de la membrana externa de *B. melitensis* y *B. ovis* (Gamazo y col., 1989). Se ignora si alguna de estas proteínas participa en la hipersensibilidad retardada (Moriyón y Gamazo, 1990).

En el caso de *B. ovis* la respuesta frente a las proteínas del grupo 3 y la de 67 kDa es fuerte y su intensidad aumenta cuando aparecen las lesiones genitales, estado en el que se detectan también anticuerpos frente a los grupos B, C y D. Es posible que la diferencia de intensidad en la respuesta frente a las proteínas de membrana en las infecciones por *B. melitensis* y *B. ovis*, sea debida a diferencias en la presentación del antígeno en la superficie y/o a grados de interacción entre las proteínas del grupo 3 y otros componentes de la membrana externa con acción inmunomoduladora. Además, hay que tener en cuenta que la ausencia de

la cadena O en *B. ovis* elimina un antígeno muy relevante (Moriyón y Gamazo, 1990).

Algunos componentes de la superficie de las células rugosas adsorben inespecíficamente inmunoglobulinas y quizás otros elementos del suero. Este fenómeno ha sido estudiado en la mutante R de *B. abortus* 45/20, pero también ocurre en células enteras de *B. ovis*, con el LPS-R y con las proteínas del grupo 3. Puesto que no se observa con células en fase L, la adsorción inespecífica tiene que ser debida a la exposición de algún componente oculto por la cadena O. En consecuencia las proteínas de la membrana externa y el núcleo del LPS, o quizás otros componentes lipídicos, son posiblemente responsables del fenómeno. Esta adsorción podría ser de tipo electrostático a un pH neutro (Moriyón y Gamazo, 1990).

2. 8. Respuesta inmunitaria humoral

La inmunidad en el caso de *Brucella* sp. se debe a un efecto combinado de mecanismos humorales y celulares.

La participación de los anticuerpos se ha estudiado en animales de laboratorio, principalmente en el ratón. En esta especie el suero es capaz de limitar la infección por dos mecanismos: a) transferencia de las bacterias al hígado y fagocitosis por células de Kupffer; b) bloqueo de la diseminación (Estein, 2006).

El LPS es considerado un antígeno timo (T) independiente, capaz de activar a los linfocitos B sin la participación de los linfocitos T colaboradores o *helper* (LTH). Los primeros anticuerpos que se generan en el curso de una infección son de clase IgM, seguidos de IgG e IgA, dependiendo de la especie animal (Castro y col., 2005). La mayor proporción de IgG que aparecen en leche provienen del suero por una transferencia selectiva de la sangre hacia leche (Norcross, 1982). Sin embargo, no se puede descartar una síntesis local de anticuerpos contra una estimulación antigénica de la glándula mamaria y luego la secreción de los mismos a través de la leche (Chand y col, 2005b).

La respuesta inmunitaria humoral a *B. ovis* ha sido estudiada a través de las pruebas serológicas clásicas. Sin embargo, sólo a través del Western blot se han podido identificar los antígenos individuales y su inmunodominancia en el curso

de la respuesta humoral. Los estudios realizados en ovinos infectados natural y experimentalmente indican que la respuesta inmunitaria humoral ha estado dirigida principalmente contra el LPS-R y las PME del grupo 3, ambos expuestos en la superficie de *Brucella* y presentes en el extracto salino obtenido por calentamiento (HS) (Riezu Boj y col, 1986). En animales con epidídimo orquíditis la respuesta fue más intensa y dirigida hacia un mayor número de proteínas que en aquéllos sin síntomas, debido probablemente a una mayor estimulación antigénica. En otros estudios se identificaron cinco antígenos inmunodominantes presentes en las fases aguda y crónica de la infección: el LPS-R, las PME de 17, 19 y 29 kDa (reconocidas por los anticuerpos monoclonales anti-*omp16*, anti-*omp19* y anti-*omp25*, respectivamente) y una proteína del estrés térmico de 63 kDa (Kittelberger y col., 1998). La investigación del suero de un carnero naturalmente infectado, estudiado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en dos dimensiones y Western blot indican que si bien hay anticuerpos dirigidos hacia las PME de 89 kDa, también se reconocen proteínas periplasmáticas y citoplasmáticas (Teixeira-Gomes y col, 1997).

Entre los animales de laboratorio, el ratón ha sido elegido para estudiar la respuesta inmunitaria a *B. ovis* (Jiménez de Bagués y col, 1993). Una de las estrategias utilizadas para identificar antígenos protectores se ha basado en la inyección de anticuerpos monoclonales anti-PME y LPS-R, previa a la inoculación de *B. ovis*. Los resultados de estos ensayos de protección indicaron que las PME menores y *omp31*, son blancos importantes de la inmunidad humoral con una importante participación del LPS-R en la protección (Bowden y col, 1995b). Si bien se desconocen cuales son los mecanismos de protección participantes, algunos autores se refieren a la opsonización como facilitadora de la muerte intracelular de *B. ovis*, lo que sugiere un probable rol de los anticuerpos, en tanto que la muerte extracelular podría estar mediada por el complemento o por las células "natural killer" (Jiménez de Bagués y col, 1994).

Con relación a la inmunidad celular, ensayos en ratón permitieron establecer que la transferencia pasiva de suero anti-HS resultó en una mayor protección que la transferencia de células sensibilizadas a dicho antígeno. El suero anti-*B. abortus* RB51 (cepa vacunal rugosa) confirió mayor protección que las células inmunes en el control de la infección por *B. ovis* (Jiménez de Bagués y col., 1994). Por lo

expuesto, la inmunidad humoral sería de importancia en la protección contra *B. ovis* (Estein, 2006).

2. 9. Diagnóstico serológico

El diagnóstico clínico de la infección por *B. ovis*, mediante la palpación de los testículos de los carneros, siempre es presuntivo, ya que aproximadamente el 50% de los animales infectados presentan anormalidades testiculares y estas alteraciones pueden ser producidas por otros microorganismos (Blasco y Jiménez de Bagués, 1990).

El único diagnóstico seguro es el directo, mediante el aislamiento e identificación de la bacteria a partir de exudados vaginales, aborto, leche, semen o tejidos. Este tipo de diagnóstico es poco práctico para realizarlo en forma rutinaria en las campañas de control; es inadecuado para detectar la enfermedad en grandes cantidades de animales y un resultado negativo no nos asegura que un animal no esté cursando la enfermedad, debido a que la eliminación de la bacteria es intermitente.

En regiones donde la incidencia de la enfermedad es nula o baja (2-3% de animales y 3-5% de majadas infectadas) los controles serológicos periódicos y el control clínico de los carneros eliminando los animales seropositivos y/o con epididimitis clínica, serían medidas suficientes para controlar la enfermedad (Blasco, 1990a; Robles, 1992). En zonas con prevalencias medias y altas la vacunación es el método más económico y práctico (Blasco, 1990b).

Generalmente se utiliza el diagnóstico indirecto, basado en la demostración de la respuesta inmune frente a antígenos de *Brucella* (Blasco y Jiménez de Bagués, 1990). La presencia de anticuerpos o la existencia de una respuesta celular específica no significan necesariamente una infección activa por *Brucella*. De ahí que los resultados del diagnóstico indirecto se deben interpretar a la luz de los datos clínicos y bacteriológicos (Blasco y Gamazo, 1994).

Según Alton y col. (1988) el diagnóstico de la brucelosis ovina se basa en la combinación del examen clínico y su confirmación mediante el aislamiento de *B. ovis* del semen y/o resultados positivos de las pruebas serológicas. Se debe tener

en cuenta la situación epidemiológica de la majada, datos reproductivos, vacunaciones y antecedentes previos de epididimitis.

Los métodos indirectos de diagnóstico incluyen las pruebas serológicas y alérgicas.

Entre los alérgenos utilizados, la brucelina del Institut National de la Recherche Agronomique, France (INRA) (Elberg, 1981; Fensterbank, 1984), permite detectar la presencia de infección en una majada (Kolar, 1984). Es una prueba de vigilancia epidemiológica muy específica para *Brucella* sp., recomendada en majadas sin una adecuada identificación de los animales (Fensterbank, y col., 1982), pero es interferida por la vacunación con *B. melitensis* Rev. 1, o por la infección con otras especies de *Brucella*. Al igual de lo que ocurre en la infección por *B. melitensis* en ganado ovino, los animales que excretan *B. ovis* pueden dar resultados negativos en las pruebas alérgicas, mientras que los animales con infección subclínica pueden ser positivos (Jones y col., 1975). Esta prueba puede ser complementaria a las serológicas (Dubray y Limet, 1987). Aunque carece de importancia para el diagnóstico individual, es de elección para identificar majadas afectadas en países sin una adecuada infraestructura para la realización de pruebas serológicas (Estein, 1999).

El carácter intracelular facultativo de *Brucella* condiciona la respuesta inmune del hospedador. Se trata de una respuesta inmunitaria mixta, de tipo humoral y celular, cuya intensidad y duración resultan influidas por muy diversos factores. Se destacan, la estructura antigénica de la cepa, virulencia, concentración, forma de contagio, edad, sexo, estado fisiológico y estado inmunitario del hospedador (Crespo León, 1994).

Las particularidades de esta enfermedad, relacionadas con su período de incubación, estado de latencia y curación aparente, influyen en el diagnóstico de tal forma que ninguna prueba inmunológica realizada individualmente, con resultado negativo, permite afirmar que el animal no la padece. Asimismo, todo animal diagnosticado como enfermo en cualquier momento de su vida debe ser considerado como tal en forma definitiva. La curación es sólo aparente y como portador puede eliminar la bacteria al medio ambiente, transmitiendo la infección al resto de la majada (Crespo León, 1994).

La prueba serológica ideal debería cumplir los siguientes requisitos: simplicidad, rapidez y bajo costo; repetibilidad de los resultados; capacidad para ser aplicada a

un gran número de individuos; sensibilidad y especificidad; capacidad para detectar hospedadores sin tener en cuenta la fase de la enfermedad y no reaccionar con animales vacunados (Dubray, 1985).

Hasta el momento no existe una prueba que cumpla con todos los requisitos enumerados, ya que ninguna puede garantizar el diagnóstico del 100% de los casos, ni permitir saber si un animal está curado o evoluciona hacia la cronicidad.

Debido a las limitaciones que presenta la detección individual de animales enfermos, los resultados de las pruebas serológicas deben interpretarse en forma colectiva y una majada se considera afectada por la enfermedad cuando se haya detectado en ella solo un animal positivo (Crespo León, 1994).

En el caso de las especies R, sus LPS carecen de cadena O, por ello se encuentran altos niveles de inmunoglobulinas (Ig) frente a las proteínas de membrana externa. No obstante es preciso tener en cuenta que la mayor parte de las propiedades biológicas del LPS reside en el lípido A (Orduña y col., 2001b). Se entiende así que, para el diagnóstico de brucelosis por especies L, se utilicen preparaciones ricas en LPS-L y, para el diagnóstico de brucelosis por especies rugosas, extractos que contengan proteínas de membrana externa y LPS-R (Blasco y Gamazo, 1994). Los isotipos inmunoglobulínicos que intervienen en la brucelosis de pequeños rumiantes son similares a los estudiados en los bovinos y, en consecuencia, los que presentan concentraciones serológicas más importantes son IgG₁, IgG₂, IgM e IgA. En la leche se encuentran los mismos isotipos, pero en diferentes concentraciones (Crespo León, 1994). En bovinos la respuesta inmunológica temprana se traduce por un incremento de IgM, seguida por la aparición de IgG₁ y más tarde pequeñas cantidades de IgG₂ e IgA. La mayoría de los anticuerpos que dan reacción cruzada con otros microorganismos o antígenos ambientales son principalmente IgM; por lo tanto las pruebas que los detectan no son deseables por los resultados falsos positivos que se producen, indicando baja especificidad del ensayo. Dado que los anticuerpos IgG₂ e IgA están presentes en pequeñas concentraciones, el principal isotipo para las pruebas serológicas es la IgG₁ y las pruebas que la detectan son las más útiles (Nielsen, 2002).

En los bovinos vacunados con vacuna *B. abortus* C-19, el nivel de anticuerpos decrece rápidamente, desapareciendo la IgG₂ y permaneciendo escasas concentraciones de IgM e IgG₁, mientras que en los animales enfermos persisten

durante más de 6 meses elevados niveles de IgG₁ e IgG₂ (Díaz y Blasco, 1986; 1989). Este hecho puede hacerse extensivo a ovinos y caprinos en similares circunstancias. Cuando se infectaron experimentalmente carneros sexualmente inmaduros la prueba de FC resultó positiva en la segunda semana y alcanzó un título máximo en la cuarta semana (Cerri y col., 1999).

En la infección experimental de carneros las IgM aparecen entre el tercer y quinto día de la inoculación, alcanzando la concentración máxima el día 19. Los isotipos IgG aparecen en pequeña proporción el sexto día y van aumentando gradualmente, igualándose las concentraciones de ambas alrededor del día cincuenta y siete tras la inoculación (Massalski, 1973).

También los LPS de la pared celular son capaces de inducir respuestas muy potentes que producen incrementos de IgG e IgM, estimulación del complemento y actividad adyuvante entre otras, siendo los antígenos inmunodominantes en *B. ovis* LPS (8-12kDa) y PME (29kDa), entre otros (Ladds, 1985; Foster y col., 1987; Paolicchi y col., 2000a; Paolicchi, 2001).

Como se indicó en el punto 2.1, los ovinos son susceptibles a la infección con cepas lisas, especialmente *B. melitensis*, y a la específica de especie, *B. ovis*.

Las pruebas que se utilizan para el diagnóstico serológico de la infección por *B. melitensis*, son: Rosa de Bengala (RB), aglutinación lenta en tubo (SAT), aglutinación con 2-mercaptoetanol (2-ME), FC, inmunodifusión radial inversa (IRI), contrainmunolectroforesis (CIE), ELISA (Blasco y Jiménez de Bagués, 1990), prueba con antígeno tamponado en placa (BPA) y polarización fluorescente (FPA) (Castro y col., 2005).

La técnica de RB por su elevada sensibilidad resulta adecuada como prueba tamiz para detectar majadas infectadas con *B. melitensis*, (Blasco y Jiménez de Bagués, 1990; OIE, 2004b). En pequeños rumiantes, si se reduce del 8% al 5% la concentración del antígeno, se logra aumentar la sensibilidad (Blasco y Jiménez de Bagués, 1990). También se puede modificar la cantidad de suero (75µl) y de antígeno (25µl), (OIE, 2004b) o utilizar 9 µl de suero y 3 µl de antígeno, quedando una concentración final del antígeno de aproximadamente 3% (Méndez Náñez y col., 1999).

El diagnóstico serológico de brucelas rugosas es dificultoso, porque carecen del O-polisacárido inmunodominante en su LPS, el cual es la base para gran parte de las pruebas serológicas y por la naturaleza de los antígenos de superficie celular,

que tienden a autoaglutinarse y a veces activan el complemento en ausencia de anticuerpos (Nielsen y col., 2004a).

El diagnóstico serológico de brucelosis causada por *B. canis* se realiza utilizando antígenos proteicos o preparados con R-LPS, en este último la especificidad está dada por el PS (Lucero, 2004).

Aprovechando la reactividad cruzada de *B. canis* con *B. ovis*, esta última ha sido utilizada como antígeno para el diagnóstico de brucelosis canina (Alton y col., 1988). Pero una cepa mutante (M-) de *B. canis* ha demostrado ser más específica (Carmichael y Joubert, 1987).

Las pruebas serológicas usualmente utilizadas en caninos son una prueba rápida de microaglutinación (RSAT) y una prueba de aglutinación en tubo (ambos con un tratamiento previo con 2-mercaptoetanol). Estas pruebas son muy sensibles pero presentan resultados falsos positivos. La IDGA ha sido utilizada pero a veces las bandas de precipitación son difíciles de interpretar. Más recientemente ha sido propuesto un IELISA que usa como antígeno un extracto salino caliente de *B. canis* (M-), que presenta alta sensibilidad y especificidad (Lucero y col., 2002).

Otros métodos utilizados en el diagnóstico de brucelosis canina han sido la fijación del complemento, la inmunofluorescencia indirecta (Wanke, 2006) y la contraelectroforesis (Borie y col., 2002).

Con *B. ovis* no se ha logrado mantener suspensiones estables y por lo tanto las pruebas basadas en aglutinaciones no son de utilidad (Robles, 1988).

Según Blasco y Jiménez de Bagués (1990), para el diagnóstico serológico de la infección por *B. ovis* se ha utilizado una importante variedad de técnicas tales como la aglutinación (no es adecuada, porque el antígeno no forma suspensiones estables), hemoaglutinación indirecta, inmunofluorescencia indirecta (Ajai y col., 1980), la prueba del anillo en leche (Ring Test), radioinmunodifusión (Chin y col., 1983), inmunolectroforesis (Myers y Varela-Díaz, 1979) e inmunoblotting (Kittelberger y col., 1994; Ebani y col., 2000). Ninguna de estas pruebas ha encontrado un uso diagnóstico extenso (Nielsen y col., 2004a). Las técnicas de IDGA y de FC, son difíciles de estandarizar aunque la FC es reconocida para el comercio internacional de ovinos (Nielsen y col., 2004a). Las diferencias en el diagnóstico dependen mayoritariamente de la naturaleza del antígeno que se emplea. La hemoaglutinación indirecta, usando antígeno sonificado de *B. ovis* no tuvo aceptación debido al alto número de falsos negativos y a las dificultades en

su estandarización (Estein, 1999). La inmunofluorescencia indirecta si bien es específica posee una sensibilidad menor que la FC (Afzal y Kimberling, 1986), el Ring Test no es efectivo en caprinos y ovinos (Alton y col., 1988; Bercovich y col., 1998; OIE, 2004a).

Una técnica de reciente uso es la FPA, que puede usarse en sangre entera o suero y se recomienda para el diagnóstico en bovinos y porcinos (OIE, 2004b; Castro y col., 2005). Los ensayos realizados con FPA en ovinos aún no han dado buenos resultados y necesitan mayor desarrollo experimental (Nielsen y col., 2004a, Nielsen y col., 2005).

Los métodos comúnmente utilizados para el diagnóstico serológico de *B. ovis* son: IDGA (Myers y col., 1972; Chin y col., 1983) y FC (Muncz y col., 1979; Burgess y Norris, 1982). Ambas pruebas tienen desventajas en cuanto a que son muy trabajosas, difíciles de estandarizar, lentas, requieren grandes cantidades de reactivos y los resultados son de interpretación subjetiva (Nielsen y col., 2004a). No obstante son las más difundidas, además de la ELISA indirecta (IELISA), que utiliza extracto soluble de *B. ovis* como antígeno.

Para la realización de todas las pruebas serológicas es importante la estandarización del antígeno utilizado. Se pueden emplear antígenos obtenidos mediante sonicación; LPS-R libre de proteínas por tratamiento con éter de petróleo-cloroformo-fenol; extractos de la ME obtenidos con desoxicolato o por extracción salina en caliente (HS) (Afzal y col., 1984; Blasco y Jiménez de Bagués, 1990; Ficapal y col., 1995; Robles, 1998) a partir de la cepa de *B. ovis* REO 198. El HS que contiene proteínas (45-65%) y lipopolisacárido rugoso (40-55%) (Riezu-Boj y col., 1990) es un antígeno recomendado debido a su solubilidad en agua, fácil obtención y rico en antígenos inmunodominantes (Gamazo y col., 1989; Marín y col., 1989; OIE, 2004a). Los extractos HS contienen determinantes LPS específicos para *B. ovis*, pero también otros componentes antigénicos adicionales, algunos de ellos compartidos con *B. melitensis* R y L, y con otras especies de *Brucella*. Dichos componentes deben ser considerados en las reacciones cruzadas observadas a veces con ese antígeno y sueros de ovinos infectados con *B. melitensis* o vacunados con Rev. 1. El HS liofilizado se resuspende en agua destilada para utilizar en la IDGA, en solución salina tamponada de Veronal para utilizar en FC o en solución tamponada de carbonato/bicarbonato o PBS para utilizar en IELISA (OIE, 2004a).

En la prueba de FC, la sensibilidad y especificidad dependen del tipo de antígeno utilizado (los del tipo HS proporcionan mayor sensibilidad) y de la temperatura de incubación (en frío a 4°C o en caliente a 37°C). Con respecto a la temperatura de incubación, la sensibilidad del método frío (4°C, 14-18 h) es superior al método en caliente (37°C, 1-4 h), pero la especificidad es menor (Alton y col., 1988), aunque según Blasco y Jiménez de Bagués (1990), las diferencias basadas en ambas temperaturas de incubación son mínimas.

El diagnóstico y descarte de los animales positivos, basado en la FC con antígeno HS, combinados con la palpación escrotal, han dado resultados satisfactorios en los programas de erradicación de la enfermedad en Australia y Nueva Zelanda (Niilo, 1984).

La FC no está estandarizada pero se puede llevar a cabo utilizando el método de microtitulación (OIE, 2004a). Generalmente a los sueros con un título de 50 ICFTU/ml o más se los considera positivos en la Unión Europea (OIE, 2004a).

Las desventajas que presenta esta prueba son las siguientes: es compleja, requiere una rigurosa estandarización y titulación de cada uno de los reactivos (Sanchis y Abadie, 1986), tiene menor sensibilidad y especificidad que la IDGA (Myers, 1973; Ris y Te Punga, 1984; Vigliocco y col., 1997), no es compatible con el uso de sueros hemolizados o anticomplementarios y necesita inactivación del suero (OIE, 2004a).

Para la detección de anticuerpos precipitantes contra *B. ovis* en ovinos se han utilizado varias técnicas. La más común es la IDGA, con antígeno HS de *B. ovis* (Blasco y Jiménez de Bagués, 1990). Es una técnica cualitativa, simple y económica reportada por primera vez por Myers y Siniuk, (1970), siendo práctica como diagnóstico de rutina en laboratorios no especializados (OIE, 2004a). Presenta una sensibilidad similar o superior a la de FC, siempre que se realice en condiciones óptimas. Cada lote de antígeno HS debe titularse frente a sueros de carneros con cultivo positivo; la concentración de antígeno varía entre 2 y 20 mg/ml, según los lotes. Los geles de agarosa con un 5% de CINA tienen mejor sensibilidad que aquéllos que contienen sólo 0,85% de CINA, aunque si la concentración de CINA se incrementa hasta el 10%, se optimiza la sensibilidad para sueros ovinos. Los anticuerpos involucrados en esta prueba son mayoritariamente del isotipo IgG (Blasco y Jiménez de Bagués, 1990). Las mayores desventajas son que el antígeno no ha sido estandarizado, los

resultados se leen recién a las 48-72 h y es solo cualitativo, aunque esto último no necesariamente es un problema (Robles, 1998). Basados en la IDGA, Myers y Varela Díaz (1979) desarrollaron una prueba de contraelectroforesis (CIE). Los resultados son comparables con los de la IDGA y FC, con la ventaja de que los resultados se tienen en pocas horas (Robles, 1998). Sin embargo la técnica requiere instrumental especial y una mayor tecnificación del personal (Blasco y Jiménez de Bagués, 1990).

La IELISA está muy difundida ya que es más sensible que la FC e IDGA (Marín y col., 1989; Nielsen y col., 2004a; OIE, 2004a) y además no es necesario inactivar los sueros como en la FC (Worthington y col., 1984), no tiene problemas con sueros hemolizados o anticomplementarios (Spencer y Burgess, 1984), trabaja con una sola dilución de suero (Ris y col., 1984) y requiere una mínima cantidad de antígeno. En general IELISA utiliza reactivos más estables que los que se usan en la FC (Rahaley y col., 1983), puede ser totalmente automatizada, lo que permite procesar un gran número de sueros. Además es capaz de detectar cualquier tipo de inmunoglobulina, dependiendo del conjugado que se utilice (Robles, 1998). Los antígenos usados pueden ser particulados o solubles y se detectan anticuerpos aglutinantes y no aglutinantes (Castro y col., 2005).

La técnica de ELISA para *B. ovis* fue descrita por primera vez por Chin y por Rahaley y col. en el año 1983 (Robles, 1998); actualmente la más utilizada para el diagnóstico es la de tipo indirecto (Blasco y Jiménez de Bagués, 1990).

Se ha informado un gran número de procedimientos de IELISA para la detección de anticuerpos de *B. ovis* (Spencer y Burgess, 1984; Cho y Niilo, 1987; Marín y col., 1989; Chin y col., 1991; Saravi y col., 1993; Ficapal y col., 1995; Nunez-Torres y col., 1997; Vigliocco y col., 1997; Cerri y col., 2000; Gall y col., 2003; Nielsen y col., 2004a; Nielsen y col., 2005). En la tabla 2 se indican valores de sensibilidad y especificidad para algunas de estas pruebas referenciadas:

Referencia	% Sensibilidad	% Especificidad
Cho y Niilo (1987)	100	99,4
Marín y col. (1989)	97,6	100
Saravi y col. (1993)	100	99,2
Vigliocco y col. (1997)	96,43 ± 6,8	100
Nunez-Torres y col (1997)	97	84
Cerri y col. (2000)	100	100
Gall y col. (2003)	98,8	97,3
Nielsen y col. (2004a)	98,5 (antígeno <i>B. abortus</i> RB51)	97,8 (antígeno <i>B. abortus</i> RB51)
Nielsen y col. (2005)	100 (antígenos RLPS-R/SLPS)	100 (antígenos RLPS-R/SLPS)

Tabla 2: Comparación de sensibilidad y especificidad de distintos IELISA para el diagnóstico de *B. ovis* en suero de ovinos.

IELISA es una prueba relativamente simple, económica y muy sensible (Nielsen y col., 2004a;b). Las principales diferencias entre las distintas técnicas residen en el tipo de antígeno (Blasco y Jiménez de Bagués, 1990; Nielsen y col., 2004a), y de conjugado utilizado (Nielsen y col., 2004b).

Con relación al sustrato cromógeno, Alton (1988); Blasco y Jiménez de Bagues (1990) y OIE (2004a) indican que ABTS (2,2'-azino-bis-[3-ethylbenzthiazoline-6-ácido sulfónico]) da resultados satisfactorios, obteniéndose una separación neta entre las densidades ópticas de las poblaciones de los controles positivo y negativo. Al ABTS, se le añade peróxido de hidrógeno, disuelto en solución tampón de citrato/ácido cítrico 0,05M, pH 4,5 (Gall y col., 2003; Nielsen y col., 2004a). Como solución de lavado se utiliza PBST (fosfato 0,01M, pH 7,2, cloruro de sodio 0,15M y 0,05% de Tween 20) (Vigliocco y col., 1997; Gall y col., 2003; OIE, 2004a). La dilución del antígeno se efectúa con una solución tampón de bicarbonato de sodio, 0,06M, pH 9,6 (OIE, 2004a). La dilución del suero se realiza con PBST conteniendo agentes quelantes que reducen las uniones no específicas de proteínas séricas, el ácido etileno-di amino-tetra acético (EDTA) 0,015M y etilenglicol bis (β -amino-etil-eter)-*N,N,N',N'*-ácido tetra acético (EGTA) 0,015M, pH 6,3 (Gall y col., 2003; Nielsen, 2002).

La especificidad del conjugado enzima-antiglobulina puede aumentar la precisión del IELISA (Nielsen y col., 2004a). La enzima utilizada en el conjugado es

usualmente peroxidasa de rábano picante (HRPO) (Nielsen, 2002; OIE, 2004a) o fosfatasa alcalina (Nielsen, 2002), siendo la primera de ellas ampliamente utilizada.

La globulina utilizada en el conjugado puede ser específica de especie como globulina de conejo anti IgG ovino (Ruelas y Rosadio, 1999) o anti IgG ovina (cadenas H + L) (Alton y col., 1988; OIE, 2004a), aunque puede sustituirse con anti IgG caprina (Alton y col., 1988). Saravi y col. (1993) compararon un conjugado anti-inmunoglobulinas totales de ovino y un conjugado monoclonal anti bovino IgG₁. Este último dio resultados similares a aquellos obtenidos utilizando el conjugado anti-ovino; sin embargo, no presentó coloración inespecífica en los sueros de control y de muestreo, facilitando la lectura e interpretación de los datos. Una especificidad del 100% y una sensibilidad del 96,4% fue obtenida con el conjugado anticuerpo monoclonal anti IgG₁ bovino-peroxidasa (HRPO). Esto se debe a las reacciones cruzadas entre las cadenas pesadas de IgG₁ bovina y ovina (Nielsen y col., 2004a). Una especificidad del 84% fue obtenida usando un conjugado proteína G/HRPO (Nunez-Torres y col., 1997). Ficapal y col. (1995) encontraron que el conjugado proteína G/enzima tiene mejor comportamiento que un conjugado policlonal anti IgG ovina, pero en este caso ningún IELISA tuvo una exactitud diagnóstica superior a las pruebas de FC o IDGA (Nielsen y col., 2004a). Una proteína recombinante que combina los sitios de unión a inmunoglobulinas de las proteínas A y G, conjugada con peroxidasa fue utilizada como reactivo universal para la detección de anticuerpos contra *Brucella* sp. (Nielsen y col., 2004b). La proteína A de 42 kDa de peso molecular, es un producto natural de *Staphylococcus aureus*. La proteína G fue inicialmente aislada de *Streptococcus* sp., grupo A, con un peso molecular de 30 kDa. Ambas proteínas, si bien de un modo diferente, presentan la capacidad de unirse de manera no específica a las moléculas de inmunoglobulinas de varias especies de animales y el hombre (Nielsen y col., 2004b). Sobre esta base se preparó una molécula quimérica combinando las características de unión de ambas proteínas (Eliasson, 1988). Sikkema (1989) reportó un producto de fusión genética de las dos proteínas, el cual excluía un sitio de unión a la albúmina asociado a la proteína G. En un trabajo donde se comparó el conjugado proteína A/G-enzima con el conjugado anticuerpo monoclonal contra IgG₁ bovina, el primero resultó más sensible aunque levemente menos específico (Nielsen y col., 2004b). Lucero

y col. (2002) utilizaron la proteína recombinante A/G en un IELISA, para diagnosticar anticuerpos anti-*B. canis* en perros. En el caso específico del ovino, reacciona con la proteína G (Ficapal y col., 1995) y el canino lo hace con la A; otras especies lo hacen con las dos; por ello la proteína recombinante A/G es de elección para ser utilizada en IELISA para diagnóstico de brucelosis en distintas especies (Nielsen y col., 2004b; Nielsen y col., 2005).

En las pruebas de IELISA, se han utilizado distintos extractos antigénicos (Saravi y col., 1993; Nunez-Torres y col., 1997; Méndez Náñez y col., 1999; Ruelas y Rosadío, 1999; Cerri y col., 2000; OIE, 2000). Marín y col. (1989) y Ficapal y col. (1995) compararon el HS con RLPS, obtenidos por distintos métodos; Vigliocco y col. (1997) utilizaron el HS; Gall y col. (2003) y Nielsen y col. (2004a) usaron un extracto antigénico preparado según Galanos y col. (1969). Se ha informado que el uso de HS puede causar reacción cruzada con el suero de animales infectados con *B. melitensis*, presuntamente por compartir epitopes con las proteínas de superficie, como las proteínas de membrana externa y antígenos citosólicos como el antígeno de 18 kDa y de 29 kDa. Esto puede ser un problema cuando la infección ocurre con las dos brucelas, o cuando los animales han sido vacunados con la vacuna *B. melitensis* Rev. 1. También puede dar reacción cruzada con otras bacterias (Gall y col., 2003; Nielsen y col., 2004a). El antígeno debería ser libre de RPLS, con menos epitopes compartidos (Nielsen y col., 2004a).

Tanto en las infecciones por *B. ovis* como por *B. melitensis* existe una respuesta frente a las proteínas citoplasmáticas, humoral y celular. (Moriyón y Gamazo, 1990).

En los últimos años, se han estudiado IELISAs utilizando antígenos internos con el objetivo de disminuir las reacciones inespecíficas. En el espacio periplasmático se aisló una proteína de 26 kDa que ha sido caracterizada y clonada y que se presenta altamente conservada en el género *Brucella* (Seco-Mediavilla y col., 2003). Esta proteína recombinante (BP26) fue probada como antígeno (Arese y col., 1997; 2004; Zygmunt y col., 2002), pero los resultados obtenidos fueron inferiores que utilizando HS o RLPS. Similares resultados se obtuvieron con la proteína citoplasmática de 18kDa (Estein y col., 2002; Castro y col., 2005). Los antígenos de superficie están más expuestos que los internos y esta debe ser la razón por la cual la utilización de antígenos intracitoplasmáticos no tienen una buena sensibilidad.

Con el objetivo de simplificar el diagnóstico de brucelosis se realizaron ensayos tratando de identificar un antígeno y un procedimiento para la detección de anticuerpos en las distintas especies animales utilizando un único formato de prueba (Nielsen y col., 2004a) o la combinación de antígenos, lisos y rugosos (Nielsen y col., 2005). En el primer caso fue logrado con el antígeno RLPS de *Brucella abortus* RB51, ya que resultó adecuado para la detección de anticuerpos contra *B. ovis*, *B. abortus* RB51 y *B. canis* (Nielsen y col., 2004a). En el segundo caso se utilizó una combinación de LPS-L y LPS-R como antígeno, y una proteína recombinante A/G conjugada con peroxidasa como reactivo de detección, dando resultados satisfactorios en bovinos, caninos, caprinos, ciervos, ovinos y porcinos (Nielsen y col., 2005).

3. PRIMER OBJETIVO: Uso de un antígeno de *B. canis* para detectar anticuerpos anti *B. ovis* en el suero de carneros

3. 1. Planteo del objetivo del experimento

La producción ovina es muy importante dentro del sistema agropecuario de la Argentina. En la provincia de Corrientes, sudeste de la provincia de Buenos Aires y Patagonia, los índices productivos se caracterizan por bajos porcentajes de señalada, alto número de carneros descartados anualmente, elevada mortandad perinatal y consecuentemente disminución de los rendimientos de carne y lana por hectárea (Homse y col., 1994).

Para aumentar la eficiencia de la producción es necesario mejorar el manejo nutricional, reproductivo, genético y sanitario. Si bien el ovino puede ser afectado por *B. melitensis* y *B. ovis*, esta última ocasiona pérdidas económicas muy importantes y es un grave problema sanitario. Para superar esta situación se necesitaría contar con métodos eficientes de control de la enfermedad, que sean sencillos y económicos.

Como se detalló anteriormente, (páginas 39-41) el examen clínico del aparato genital de los carneros, basado en la detección de lesiones a nivel de epidídimo no siempre da resultados satisfactorios. Por ser el diagnóstico clínico inespecífico y por lo tanto presuntivo, la confirmación de la enfermedad se efectúa a partir del aislamiento bacteriológico de *B. ovis* (Ficapal y col., 1998) en muestras de semen o tejidos de los machos y exudados vaginales, o muestras de leche en las hembras, pero un resultado negativo no excluye la enfermedad. Las técnicas indirectas de diagnóstico, que utilizan pruebas serológicas, están muy difundidas por su eficacia y practicidad (OIE, 2004a). Se utilizan la IDGA, la cual presenta baja sensibilidad, FC, técnica engorrosa de realizar y técnicas IELISA. La OIE reconoce para el comercio internacional de ovinos y semen, la FC (OIE, 2004a). En todos los casos las pruebas se realizan con antígenos obtenidos a partir de *B. ovis*. Debido a las características de la patología en cuestión sería de mucha utilidad contar con una prueba rápida, sencilla, sensible, específica y de bajo costo, que permita evaluar grandes poblaciones.

Las especies *B. ovis* y *B. canis* comparten componentes antigénicos, presentando reacción cruzada (Lopez y col., 2005). Para el diagnóstico serológico de *B. canis*

en perros se ha utilizado como antígeno una suspensión de *B. ovis* coloreada con Rosa de Bengala (Shin y Carmichael, 1999); del mismo modo, *B. canis* podría utilizarse como antígeno para detectar anticuerpos contra *B. ovis* en ovinos (Lopez y col., 2005). Se ha informado sobre un antígeno mejorado para el diagnóstico serológico de brucelosis canina, que utiliza una cepa mucoide (M-) de *B. canis*, con la cual se reduce la tasa de falsos positivos (Carmichael y Joubert, 1987), siendo además un antígeno muy estable. Esta cepa presenta la ventaja de no requerir el agregado de suero al medio basal y tampoco necesita una atmósfera adicionada con CO₂ para su crecimiento (Lopez y col., 2004, 2005). Para el diagnóstico serológico de *B. canis* en caninos se ha propuesto la prueba de microaglutinación (RSAT) y un IELISA, utilizando antígenos preparados con *B. canis* (M-) (Lucero y col., 2002). En el primer caso el antígeno es una suspensión de células de *B. canis* (M-) coloreada con Rosa de Bengala y en el segundo una extracción salina en caliente de la cepa *B. canis* (M-).

Se han reportado reacciones cruzadas entre *Brucella* sp. en fase lisa y otras bacterias como *Yersinia enterocolitica* 0:9 que comparte la mayoría del O-polisacárido (OPS) con *B. abortus* y con *Escherichia coli* O157:H7 (Nielsen y col., 2004c). También se sabe que el uso de antígeno HS para el diagnóstico de *B. ovis* puede causar reacción cruzada con sueros de animales infectados con *B. melitensis*, presumiblemente por compartir epitopes con las proteínas de superficie. Esto podría ser problemático en caso de tener animales infectados con las dos especies o vacunados con Rev. 1 (Nielsen y col., 2004a). Según OIE (2004a), poco se sabe de resultados falsos positivos en pruebas serológicas para *B. ovis*, como consecuencia de infecciones con otras bacterias que comparten epitopes, provocando reacciones cruzadas. El agente que produce pietín, *Dichelobacter nodosus*, fue descrito como productor de dichas reacciones con *B. ovis*, pero el alcance y consecuencias prácticas de esta reactividad es desconocida (Whittington y col., 1996).

Teniendo en cuenta que *B. ovis* y *B. canis* son cepas rugosas y ambas presentan reacción cruzada, se realizó el presente trabajo comparando en una población de ovinos, las técnicas clásicas, de IDGA e IELISA que utilizan antígeno de *B. ovis*, con la técnica de microaglutinación (RSAT), RSAT con 2 mercapto-etanol (RSAT-2ME) e IELISA, con antígeno de *B. canis* en muestras de suero (Lopez y col., 2004, 2005).

3. 2. Materiales y métodos

Pruebas serológicas

La totalidad de los sueros fueron sometidos a las siguientes pruebas serológicas:

a)- Para detectar anticuerpos anti *Brucella* en fase lisa:

-Rosa de Bengala (Alton et al, 1988).

El antígeno fue preparado en el INEI-ANLIS, a partir de la cepa *B. abortus* 1119-3, utilizando como referencia el antígeno del Ministerio de Agricultura de Estados Unidos.

Se colocó 30 µl del suero en uno de los cuadrados de una placa de vidrio. A continuación se agregó 30 µl del antígeno cerca del suero y se mezclaron formando un óvalo de 20 por 24 mm. Se rotó la placa de vidrio durante 4 min en forma manual con una velocidad de rotación de 10 movimientos por minuto aproximadamente, leyendo luego la prueba sobre fondo blanco. Cualquier aglutinación se consideró positiva.

b)- Para detectar anticuerpos anti *Brucella* en fase rugosa:

- RSAT

La prueba tamiz RSAT fue realizada siguiendo la metodología previamente descrita (Carmichael y Joubert, 1987), pero con diluciones a título final (Lucero y col, 2002). Se mezclaron 10 µl de suero con 10 µl de antígeno sobre un portaobjetos de 25 mm por 75 mm durante 1-2 min y los resultados se leyeron en un microscopio óptico a 10x, incluyendo como control un suero positivo de título conocido.

- 2ME-RSAT

Fue realizado mezclando 25 µl de suero con 25 µl de solución de 2ME 0,1 M en un portaobjeto, luego de 1 min se agregó 50 µl del antígeno y se procedió como en el caso anterior.

El antígeno RSAT fue preparado en el INEI-ANLIS con la cepa *B. canis* (M-), provista gentilmente por el Profesor L. Carmichael.

- IELISA - *B. canis*

El antígeno fue obtenido a partir de la cepa *B. canis* (M-), de acuerdo al procedimiento descrito previamente (Lucero y col., 2002).

Se preparó el HS de *B. canis*, que luego fue centrifugado a 254.000 x g en una ultracentrífuga Kontron Instrument con un rotor TFT 45.94 durante 4 h a 4°C. El sedimento fue disuelto en PBS, pH 7,2 y congelado a -20°C. En la prueba se utilizó 1:2000 luego de la lectura de la densidad óptica (DO) de varias diluciones de antígeno, usando como control sueros fuertemente positivos, débilmente positivos y negativos.

Conjugado: El conjugado proteico A/G-peroxidasa liofilizado se obtuvo de Immuno-Pure (Pierce Lb) y se utilizó diluido 1/20000 luego de probar varias diluciones de trabajo con tres sueros ovinos (fuertemente positivo, débilmente positivo y negativo).

Procedimiento: El antígeno diluido en una solución tampón de carbonato de sodio 0,06M (pH 9,6) fue pegado en una placa de poliestireno de 96 hoyos (Nunc 2-69620, Dinamarca) empleando 50 µl por orificio e incubado durante 18 h a temperatura ambiente. Luego se lavó cinco veces la placa con PBS 0,01M, conteniendo 0,05% de Tween 20 pH 7,2 (PBS/T). A continuación se agregaron 50 µl por celda de los sueros control y problema, diluidos 1:50 en PBS/T y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Luego de cinco lavados con PBS/T se adicionaron 50 µl por celda del conjugado (proteína A/G peroxidasa), diluido de acuerdo a su titulación, e incubado durante 1 h a temperatura ambiente. Luego de cinco lavados con PBS/T, el paso final fue la adición de 100 µl de sustrato cromógeno (peróxido de hidrógeno 4,0 mM y 1,0 mM de ABTS [sal de amonio de 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzeno-thiazoline-6-ácido sulfónico) en solución tampón, 0,05M, pH 4,5] por celda. La placa se agitó en forma continua en un agitador orbital durante 10 min y se efectuó la lectura de la DO₄₁₄, empleando un lector de microplaca (Labsystems Multiskan EX) utilizando como blanco 100 µl del sustrato cromógeno. El desarrollo de color indicó reacción positiva.

- IDGA

El gel fue preparado disolviendo 1,2 g de agar Noble, 8,5 g de ClNa y Merthiolate 1:10000 en 100 ml de tampón tris, pH 8,2 en baño María.

Un portaobjeto colocado sobre una superficie plana se cubrió con el gel derretido (4 ml aproximadamente). Luego que el gel se solidificó se lo perforó con un sacabocado. Los orificios realizados fueron de 3 mm de diámetro y a una distancia de 3 mm entre ellos, dispuestos en un patrón hexagonal alrededor de otro orificio, también de 3 mm de diámetro. Los sueros problema y control fueron colocados en los círculos periféricos y el antígeno en el círculo central (aproximadamente 15 μ l). Los resultados fueron leídos a las 48 h luego de una incubación en cámara húmeda (OIE, 2004a).

El antígeno, HS, obtenido de la cepa REO 198 de *B. ovis*, fue suministrado por SENASA (Servicio Nacional de Sanidad Animal), que también proveyó el suero control estándar.

- IELISA - *B. ovis*

El antígeno preparado con cepa *B. ovis* 11 como lo describió Vigliocco y col. (1997), fue suministrado por CNEA, (Comisión Nacional de Energía Atómica, Argentina) y fue utilizado a una dilución 1:2500. El conjugado proteína-A/G, peroxidasa fue utilizado a una dilución de 1:30000, luego de probar varios rangos de dilución con suero ovino fuertemente positivo, débilmente positivo y negativo. El antígeno diluido en solución tampón de carbonato de sodio 0,06M (pH 9,6) fue pegado a placas de poliestireno (Nunc 2-69620, Dinamarca) a razón de 50 μ l por celda e incubado por 18 h a temperatura ambiente. Luego de lavarlo 5 veces con solución tampón fosfato 0,01M conteniendo 0,05% de Tween 20, pH 7,2 (PBS/T) se agregaron los sueros control y problema en una dilución 1:50 en PBS/T, a razón de 50 μ l por celda, incubando luego la placa durante una hora a temperatura ambiente. Luego de lavar cinco veces la placa, se agregó el conjugado, proteína A/G-peroxidasa (50 μ l por celda) y se incubó por 1 h a temperatura ambiente. El paso final, posterior al lavado fue la adición de 100 μ l del sustrato cromógeno en cada celda. Se agitó en forma continua en el agitador orbital y luego de 15 min se midió la densidad óptica (DO_{414}), en el lector de microplaca, usando una placa con 100 μ l del sustrato cromógeno como control del lector. La prueba es positiva cuando desarrolla color.

Suero control

Se utilizó un suero control estándar, provisto por SENASA, en las pruebas RSAT, IDGA y 2ME-RSAT.

El suero control para el IELISA fue obtenido de un carnero infectado en forma experimental.

Recolección de muestras

Las muestras de sangre fueron recolectadas sin anticoagulante por punción de la vena yugular y se mantuvieron a temperatura ambiente por 24 h. Luego se separó el suero que se guardó a -20°C, hasta su utilización en las pruebas. Las muestras de semen se recolectaron con hisopos, utilizando un electroeyaculador y se transportaron al laboratorio en tubos estériles, mantenidas a 4°C. Igual procedimiento se siguió con las muestras de exudado vaginal, tomadas de las hembras.

Estudios Bacteriológicos:

Todas las muestras fueron cultivadas en un medio basal con 3-5% de suero equino (libre de anticuerpos anti *B. ovis*) y antibióticos (vancomicina, 3 mg; sulfato –colicistin- metano, 7,5 mg; nistatina, 12500 unidades; nitrofurantoína, 10 mg/l) (Alton y col., 1988). Las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera con 10% de CO₂. Las colonias fueron tipificadas con el procedimiento estándar (páginas 41-44) recomendado por Alton y col. (1988) y Corbel y Morgan (1984).

Sueros ovinos y población en estudio

Cincuenta y un sueros (23 machos y 28 hembras) provenían de una majada no infectada, localizada en el sur de la provincia de Buenos Aires, controlada periódicamente y con ausencia prolongada de evidencia clínica y epidemiológica de brucelosis, y negativos a las pruebas de RB e IDGA. Este grupo fue utilizado para determinar la especificidad del IELISA -*B. ovis*, IELISA -*B. canis*, RSAT y 2ME-RSAT.

Treinta y dos sueros de carneros fueron recolectados de una majada infectada en forma natural con *B. ovis*, probado por examen clínico, bacteriológico y serológico. Fueron provistos por el INTA Balcarce de Argentina y se utilizaron para calcular la sensibilidad del IELISA -*B. ovis*, IELISA -*B. canis*, RSAT y 2ME-RSAT.

Ciento cuarenta y dos sueros se obtuvieron de tres majadas sospechosas de estar infectadas, de acuerdo al examen clínico y abortos esporádicos, pero con estudios bacteriológicos negativos. Sesenta eran de hembras Milschaf y cruzas Corriedale (utilizadas para la producción de quesos de pasta semidura), del centro de la provincia de Buenos Aires; sesenta y tres de carneros del sur de la provincia de Buenos Aires y diecinueve carneros, de la República Oriental del Uruguay.

Análisis de los datos

Los valores de densidad óptica (DO) obtenidos en los IELISA, fueron comparados con aquéllos obtenidos con los sueros controles incluidos en cada placa, y con ellos se calculó el valor relativo de positividad (%P):

$$\%P = \frac{DO_{414} \text{ de la muestra}}{DO_{414} \text{ del suero control}} \times 100$$

La sensibilidad diagnóstica se define como la capacidad de un ensayo de dar un resultado positivo cuando el animal está enfermo. La definición de animal enfermo se puede basar en la observación microbiológica, patológica, clínica o en resultados de otras pruebas serológicas (Cannon y Roe, 1982). Lo ideal es que sea independiente de los ensayos que están siendo evaluados (Baldock, 1988). La manera de expresar la sensibilidad es mediante una tabla de 2 x 2:

		Ensayo de referencia		
		+	-	
Ensayo Nuevo	+	A	B	$sensibilidad = \frac{A \times 100}{A + C}$
	-	C	D	

La especificidad es la capacidad de un ensayo para dar un resultado negativo cuando el animal no está enfermo (Cannon y Roe, 1982). La definición de animal no enfermo debe acordarse de antemano:

		Ensayo de referencia		
		+	-	
Ensayo Nuevo	+	A	B	$especificidad = \frac{D \times 100}{B + C}$
	-	C	D	

Los valores de sensibilidad y especificidad están sujetos a variaciones de muestreo y deben ser presentados con intervalos de confianza. El intervalo de confianza del 95% se calcula igual para sensibilidad o especificidad por la siguiente fórmula:

$$L = 1.96 \times \sqrt{\frac{p \times q}{n}}$$

L = un lado del intervalo de confianza al 95%

p = proporción observada

q = 1- p

n = número de muestras

Valor de corte tentativo:

Con la distribución de las frecuencias de las muestras positivas y negativas en un histograma de frecuencia se obtiene un valor de corte tentativo ya que hay una superposición de valores falsos positivos y falsos negativos (Wright y col., 1993).

Análisis de las características del operador – receptor (ROC)

La curva ROC representa el compromiso entre las frecuencias relativas de los verdaderos positivos, falsos positivos, verdaderos negativos y falsos negativos, variando el valor de corte (Metz, 1978).

Es decir que representa la fracción de los positivos verdaderos frente a la fracción de los falsos positivos para varios valores de corte en forma simultánea, produciendo un gráfico que da la sensibilidad y especificidad con los distintos valores de corte. Esto permite seleccionar el más adecuado para el ensayo (Schoonjans y col., 1995), si se debe aumentar la sensibilidad se disminuye la especificidad y a la inversa. La razón entre la fracción de los positivos verdaderos y los positivos falsos en cada punto de la curva representa la pendiente en ese punto y se conoce como la razón de la probabilidad. Cada punto de la curva ROC es una tabla de decisión 2x2 para cada valor de corte, es decir que resume todas las tablas posibles para determinar la sensibilidad y especificidad.

La línea diagonal es la línea de posibilidad ya que para cada punto de esta línea, los valores positivos verdaderos igualan los valores positivos falsos. A mayor altura por sobre esta línea, mejor será la discriminación entre los resultados de las muestras de referencia positivas y negativas.

Otro aspecto importante es el área bajo la curva que es una medida de la detectabilidad y va desde 0.5 detectabilidad debido al azar y 1 detectabilidad perfecta.

En la curva ROC la sensibilidad es la fracción de verdaderos positivos, y uno menos la especificidad, es la fracción de los falsos positivos.

3. 3. Resultados

Los 225 sueros que se utilizaron en este estudio fueron negativos a la prueba de RB.

El grupo de 51 sueros de la majada no infectada resultó negativo al RSAT y al 2ME-RSAT; IELISA *-B. canis* tuvo un valor promedio de 21,39 (%P) (DS 7,66); la IDGA fue negativa; la IELISA *-B. ovis* tuvo un valor promedio de 23,05 (%P) (DS 11,8). El gráfico 2 muestra la frecuencia de distribución de estos sueros con los cuales se calculó empíricamente el valor de corte de 36,71 (%P) (2 DS) o 44,37 (%P) (3 DS), con IELISA *-B. canis* y 46,65 (%P) (2 DS) y 58,45 (%P) (3 DS), con IELISA *-B. ovis* (gráfico 3).

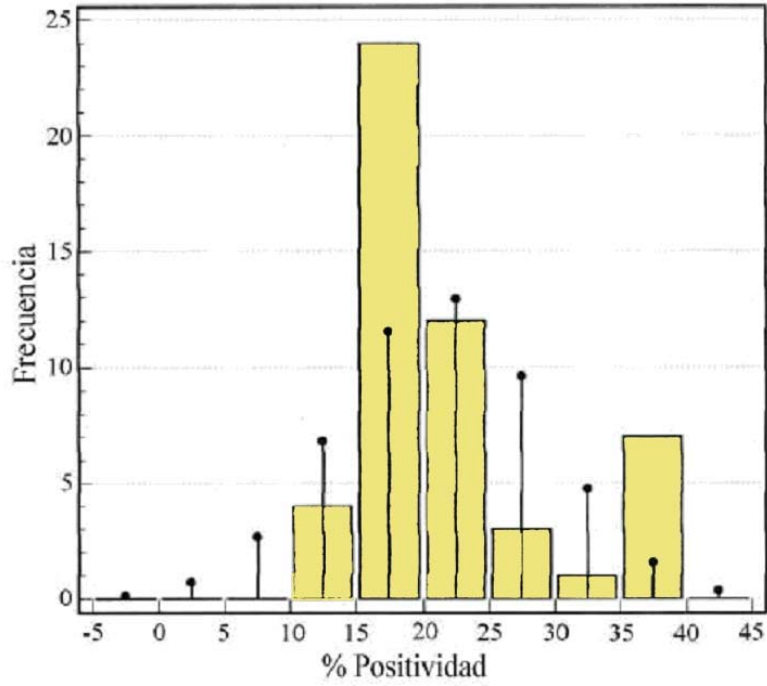


Gráfico 2: Distribución de frecuencias de IELISA-B.canis para detectar anticuerpos de *B. ovis* en 51 muestras de sueros

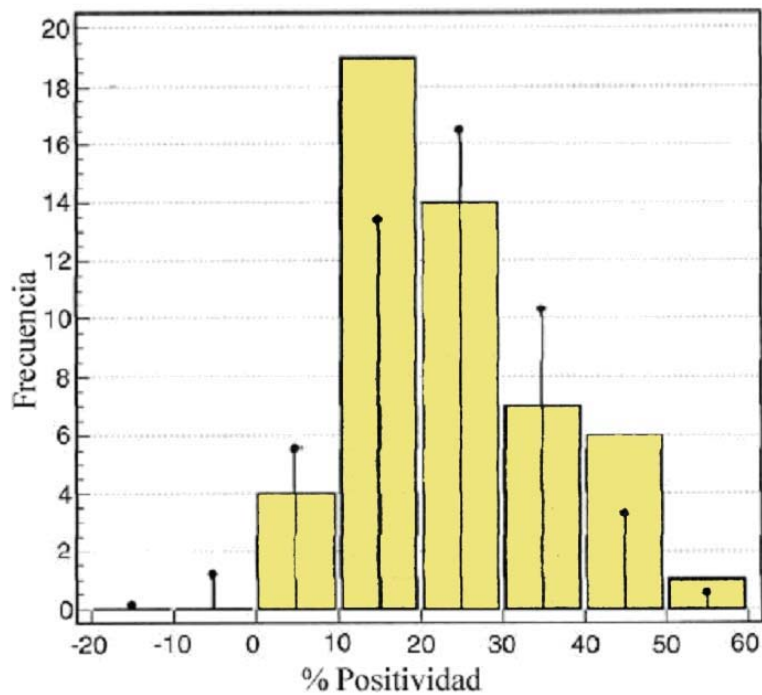


Gráfico 3: Distribución de frecuencias de IELISA-B.ovis para detectar anticuerpos de *B. ovis* en 51 muestras de sueros.

Estos valores de corte fueron ajustados por análisis de la curva ROC, utilizando los 51 sueros negativos y los 32 sueros positivos, obteniéndose un valor de corte

para IELISA *-B. canis* de 39 (%P) y 51 (%P), para IELISA *-B. ovis*, con un 100% de sensibilidad y especificidad.

En la tabla 3 se resumen los resultados de las pruebas serológicas efectuadas en los 32 sueros positivos de la majada infectada y el resultado de los estudios clínicos y bacteriológicos.

RSAT detectó los 32 sueros positivos (100%); 2ME-RSAT 29 (91%); IELISA *-B. canis* 32 (100%); IDGA 31 (97%) y el IELISA *-B. ovis* 32 (100%). En el examen clínico se encontraron lesiones a nivel epididimario en 21 de los 30 carneros y *B. ovis* fue aislada en cuatro casos.

De los 142 sueros provenientes de las majadas sospechosas (tabla 4), 46 fueron negativos y 56 positivos a todas las pruebas; 16 fueron positivos con RSAT; IELISA *-B. canis* e IELISA *-B. ovis*; 20 positivos solo con RSAT y 2 positivos con ambas IELISA. El examen clínico detectó lesiones compatibles con pietín en 5 casos, orquioepididimitis y monorquitis en 2 casos.

3. 4. Discusión

Todos los animales evaluados con la prueba RB resultaron negativos, esto coincide con lo expresado con otros autores que afirman que la brucelosis por *B. melitensis* en ovinos no parece ser un problema importante en la Argentina (Samartino, 2002).

La vía de transmisión venérea de *B. ovis* a través de las ovejas es una ruta frecuente de infección, pero la transmisión carnero a carnero también es común (Blasco, 1990). La detección de lesiones genitales por palpación del contenido escrotal de los carneros puede indicar infección, pero este método no es lo suficientemente sensible. Nuestros estudios coinciden con los de otros investigadores que indican que el diagnóstico clínico es extremadamente inespecífico ya que otras bacterias también causan epididimitis.

De los 32 animales de la majada infectada, 21 (66%), presentaron lesiones clínicas, pero de 142 animales de las majadas sospechosas, donde se detectaron animales positivos, sólo fueron examinados clínicamente 79 animales, de los cuales 17 fueron serológicamente positivos a *B. ovis* y 16 sospechosos de tener brucelosis. Fue detectado pietín en 5 casos (3 serológicamente negativos, 2

débilmente positivos sólo con RSAT), un carnero presentó orquioepididimitis (serológicamente positivo) y otro monorquitis (serológicamente negativo).

Si bien el diagnóstico bacteriológico es recomendado como una prueba confirmatoria, este método es inadecuado para la detección de la enfermedad en un gran número de ovinos, ya que falla para identificar todos los animales infectados (Jones y col., 1975; Worthington y col., 1985).

De los métodos serológicos utilizados para detectar anticuerpos contra *B. ovis*, IELISA ha demostrado ser el más sensible y específico. Diversos trabajos realizados por distintos autores, utilizando variantes en la metodología y los conjugados, coincidieron en recomendar el IELISA para el diagnóstico serológico de la enfermedad.

Con los 51 sueros de la majada libre de la enfermedad y 32 sueros de la majada infectada, la especificidad y sensibilidad fue del 100% con el valor de corte 51 (%P) y 39 (%P) para IELISA-*B. ovis* e IELISA-*B. canis* respectivamente.

suero nº	Antígeno <i>B.canis</i>			Antígeno <i>B.ovis</i>		Resultados clínicos y bacteriológicos
	RSAT*	2ME-RSAT*	IELISA	IDGA**	IELISA	
1	+/-	Neg	65	++	95	CL
2	2	Pos	57	Neg	100	CL
3	Pos	Pos +/-	56	++	96	CL
4	Pos	Pos +/-	68	++	100	CL
5	2	Pos	90	++	100	NI
6	4	Pos	85	++	100	NI
7	2	Pos +/-	100	+++	100	CL
8	Pos	Pos +/-	80	+++	100	CL
9	4	2	67	+++	100	CL
10	Pos	Pos +/-	100	+++	83	NI
11	Pos	Neg	58	+++	98	CL
12	Pos	Pos +/-	100	+++	100	CL
13	2	Pos +/-	100	+/-	62	CL
14	2	Pos	100	++	98	CL
15	Pos	Pos +/-	100	++	89	CL
16	+/-	Pos +/-	47	++	74	CL
17	+/-	Neg	62	++	52	CL
18	4	2	80	++	100	NI
19	8	8	87	+++	100	NI
20	2	2	58	+++	100	NI
21	2	Pos	81	+++	99	NI
22	2	Pos	100	+++	100	NI
23	4	Pos	100	+++	100	NI
24	2	Pos	88	+++	87	CL
25	4	Pos	96	+++	78	CL
26	16	8	93	+++	77	CL
27	4	2	100	+++	100	CL
28	4	2	99	+++	100	CL
29	2	Pos	91	+++	100	CL
30	2	Pos	79	+++	75	CL
31	2	Pos	98	+++	100	B+
32	Pos	Pos +/-	90	++	100	B+

CL: lesiones clínicas, B+: Aislamiento *B.ovis*; NI: No información; RSAT: Test de microaglutinación rápida; 2ME-RSAT: 2 mercapto etanol-RSAT

IELISA-*B.canis*: valor de corte (%P) 39; IELISA-*B.ovis*: valor de corte (%P) 51; IDGA: Inmunodifusión en gel de agar

* Reciprocidad de la dilución mas alta que produce microaglutinación

** (+, ++, +++, +++) Muy débil, débil, moderado y fuertemente positivo

Tabla 3: Resultados serológicos, clínicos y bacteriológicos de 32 ovinos (RB negativos)

n	Antígeno <i>B.canis</i>			Antígeno <i>B.ovis</i>	
	RSAT	2ME-RSAT	IELISA	IDGA	IELISA
56	P	P	P	P	P
7	P	P	P	N	P
2	P	N	P	P	P
7	P	N	P	N	P
9	P	P	N	N	N
2	P	N	N	N	P
11	P	N	N	N	N
1	N	N	P	N	P
1	N	N	N	N	P
46	N	N	N	N	N
142	94	72	73	58	76

P: Positivo; N: Negativo

Tabla 4: Resultados serológicos de 142 sueros ovinos sospechosos de tener brucelosis causada por *B.ovis*

El estudio de los animales sospechosos de tener brucelosis reveló que 73 eran positivos al IELISA –*B. canis* y 76 al IELISA –*B. ovis*, indicando que los antígenos *B. ovis* y *B. canis* presentaron resultados similares. Estos datos concuerdan con los publicados por Nielsen y col. (2004a) que usaron cepa R-RB51 como antígeno para la detección de anticuerpos anti *B. ovis*.

Si bien la IDGA resulta una prueba simple, cuando se compararon RSAT, 2ME-RSAT e IDGA como tamiz, las tres pruebas fueron negativas en el grupo de 51 animales no infectados, sin embargo en el grupo de 32 animales positivos RSAT detectó el 100%, IDGA el 97% y 2ME-RSAT el 91%.

Las pruebas tamiz fueron realizadas en los 142 animales sospechosos de estar infectados con brucelosis y 94 fueron RSAT positivos, 72 2ME-RSAT y 58 IDGA, positivos respectivamente.

Dado que *B. ovis* comparte componentes antigénicos con *B. canis*, ambas especies de *Brucella* podrían ser utilizadas como antígeno con los mismos resultados. Sin embargo la cepa de *B. canis* (-M) tiene la ventaja de permitir el desarrollo de un antígeno útil para las pruebas de aglutinación.

El antígeno para RSAT ha demostrado ser estable hasta 2 años cuando se mantiene en frascos conteniendo perlas de vidrio estériles para dispersarlo, previo a la utilización. Es una prueba tamiz muy sensible, cuya simplicidad y fácil interpretación la harían adecuada para reemplazar la IDGA en el diagnóstico de brucelosis ovina causada por *B. ovis*.

Dado que IELISA *-B. canis* e IELISA *-B. ovís* tuvieron la misma sensibilidad y especificidad, podrían ser utilizadas en forma indistinta como pruebas confirmatorias. El suero control utilizado en cada placa permite convertir la densidad óptica en porcentaje de positividad.

El conjugado proteína liofilizada A/G-peroxidasa, que se usó en las IELISAs es útil para la detección de anticuerpos contra antígenos LPS-S y LPS-R, en distintas especies animales (Nielsen y col., 2004b).

4. SEGUNDO OBJETIVO: Detección de anticuerpos anti *B. ovis* en leche de ovejas utilizando un antígeno de *B. canis*.

4. 1. Planteo del objetivo del experimento

Aunque Argentina fue tradicionalmente un país orientado a la producción de ovinos con biotipo lanero, a partir del año 1990 la producción de leche para la fabricación de quesos, especialmente de pasta semidura, tuvo un incremento importante y las perspectivas parecieran ser promisorias para los próximos años, tanto para el consumo interno como para la exportación. En la provincia de Buenos Aires se encuentra el mayor número de establecimientos productores de leche ovina (50%), seguido por la provincia de Chubut (18%) (McCormick y col., 2003).

Como se mencionó en las páginas 21 y 29, la brucelosis causada por *B. ovis* produce pérdidas productivas considerables. Por este motivo es importante brindar al productor de ovinos lecheros herramientas efectivas y sencillas que permitan controlar la enfermedad.

Las hembras son más resistentes que los machos (Buddle, 1955; Hartley y col., 1955; Kimberling y Schweitzer, 1989; Blasco y Barberán, 1990), esto ha sido demostrado en varios estudios donde la prevalencia de la infección fue entre dos y diez veces mayor en machos que en hembras (Robles, 1998). Sin embargo hembras gestantes inoculadas con *B. ovis* abortaron en el último tercio de la preñez, con eliminación del microorganismo a través de la secreción vaginal y por leche, durante toda la lactancia (Grillo y col., 1995). Meinershagen y col. (1974) afirman que la inoculación experimental en hembras gestantes solo provoca abortos en una pequeña proporción de animales.

Se ha informado que IELISA es una técnica útil como prueba tamiz para detectar anticuerpos tanto en sueros como en leche de bovinos (Nielsen y col., 2004b). La ventaja de utilizar leche es que se puede tomar la muestra de una manera no invasiva y en forma más rápida, reduciendo el estrés (Rivera y col., 2003; Lopez y col., 2006). La prueba de IELISA ha sido utilizada para detectar anticuerpos anti - *B. abortus* en leche de vacas y anti-*B. melitensis* en leche de ovejas (Heck y col., 1980; Alton y col., 1988; Kerkhofs y col., 1990; Biancifiori y col., 1996, Nielsen y col., 1996; Chand y col., 2004; 2005a,b) pero hasta ahora no ha sido investigada

para detectar anticuerpos en leche de ovejas infectadas con *B. ovis*. Nielsen y col. (2004a) demostraron que LPS-R de *B. abortus* RB51 puede ser usado como antígeno para detectar anticuerpos contra *B. ovis*, *B. canis* y *B. abortus* RB51 por las técnicas de ELISA y FPA. Recientemente hemos reportado que *B. canis* podría utilizarse como antígeno para el diagnóstico de anticuerpos contra *B. ovis* ya que ambas comparten componentes antigénicos (Lopez y col., 2005).

En bovinos los resultados obtenidos con ELISA en leche y suero muestran una alta correlación (Biancifiori y col., 1996). Bercovich y Taaijke (1990) consideran que en leche es la prueba más específica, aunque puede fallar cuando la concentración de IgG₁ es muy baja. Se ha informado que es más sensible que el Ring Test y permite detectar anticuerpos en leche con anterioridad a este (Kerkhofs y col., 1990). La prueba del Ring Test puede verse afectada por diversos factores como: presencia de mastitis, calostro o leche del último período de lactancia (Nielsen, 2002) y cantidad de grasa en la leche (López y col., 1998). Todos los isotipos de anticuerpos en la leche (IgA, IgM, IgG₁, e IgG₂) pueden intervenir en el Ring Test positivo, pero IgA es el principal isotipo involucrado en la reacción junto a IgM, mientras que IELISA detecta toda clase de anticuerpos contra el antígeno LPS (Sutra y col., 1986; Díaz y Blasco, 1994; Chand y col., 2004). Para el diagnóstico de *B. melitensis* en leche de ovejas el IELISA es una prueba útil cuando se evalúan animales en forma individual (Biancifiori y col., 1996), en caprinos se utilizó en muestras colectivas pero de un número reducido de animales (Funk y col., 2005). El Ring Test no es efectivo para el diagnóstico de brucelosis en leche de cabras y ovejas (Alton y col., 1988; Garin-Bastuji, 1992; Bercovich y col., 1998), según Crespo León, (1994) es debido a las características del glóbulo graso de caprinos y ovinos y a la escasez de anticuerpos anti-*Brucella* en la leche de los animales enfermos; por este motivo se recomienda utilizarlo en leches individuales o, a lo sumo en leche de 2 o 3 animales. Chand y col. (2004) compararon un IELISA con el Ring Test en leche de ovejas infectadas con *B. melitensis* y concluyeron que el IELISA es más sensible. Estos mismos autores (Chand y col., 2005b) compararon el IELISA en leche e IELISA en suero, para diagnosticar la infección en ovejas por *B. melitensis* y encontraron que el IELISA en leche brinda resultados similares al IELISA en suero y en el caso de ovejas en lactancia puede utilizarse el primero en reemplazo del segundo, ya que las IgG en

leche provienen del suero a través de una transferencia selectiva de dicha inmunoglobulina de la sangre circulante (Norcross, 1982).

En este trabajo se comparó un IELISA en leche con un IELISA en suero, para el diagnóstico de brucelosis causada por *B. ovis* en ovejas, utilizando antígeno *B. ovis* y *B. canis* (Lopez y col., 2006a;b).

4. 2. Materiales y métodos

Pruebas serológicas

a)- Para detectar anticuerpos anti *Brucella* en fase lisa:

- RB:

Fue realizado como se describió previamente (Alton y col., 1988). El antígeno fue preparado en el INEI-ANLIS, a partir de la cepa *B. abortus* 1119-3, utilizando como referencia el antígeno del Ministerio de Agricultura de Estados Unidos.

b)- Para detectar anticuerpos anti *Brucella* en fase rugosa:

- RSAT.

Fue utilizada como tamiz y descripta previamente (Lopez y col., 2005). El antígeno fue preparado en el INEI-ANLIS, usando la cepa (M-) de *B. canis*.

- IELISA –*B. canis*:

Este antígeno fue obtenido de la variante (M-) de *B. canis* tal como se describió previamente. (Lucero y col., 2002). El procedimiento utilizado fue el descrito por Lopez y col. (2005) y la prueba es positiva cuando el %P es 39 o mayor.

- IDGA:

El gel fue preparado según el procedimiento descrito en pág. 68. El antígeno (HS), obtenido de la cepa REO 198 de *B. ovis*, fue suministrado por SENASA, Argentina (lote 01-05), quien también proveyó el suero control estándar (lote 4-

04). Los resultados fueron leídos luego de la incubación por 48 h a temperatura ambiente en cámara húmeda.

- IELISA –*B. ovis*

El antígeno preparado con *B. ovis* cepa 11 como lo describió Vigliocco y col. (1997) fue suministrado por CNEA, Argentina y utilizado 1:2500. El conjugado proteína liofilizada A/G-peroxidasa, fue usado en dilución 1:25000, luego de probar varias diluciones de trabajo con suero ovino fuertemente positivo, débilmente positivo y negativo. La prueba es positiva cuando el %P es 51 o mayor (Lopez y col., 2005).

Pruebas en leche

Las pruebas en leche, IELISA-*B. canis* e IELISA-*B. ovis*, fueron realizadas con el mismo procedimiento utilizado con los sueros, excepto que la leche fue diluida 1:2 en PBS/T.

Se usaron controles fuertemente positivo (oveja infectada naturalmente, detectada por métodos serológicos y bacteriológicos), débilmente positivo (oveja con título serológico bajo procedente de un rebaño naturalmente infectado) y negativo (oveja de un rebaño no infectado sin evidencia clínica, epidemiológica y bacteriológica de brucelosis).

- IELISA –*B. canis*:

El antígeno fue obtenido de la variante (M-) de *B. canis* tal como se describió previamente (Lucero y col., 2002). Fue utilizado en una dilución 1:2000.

El conjugado proteína liofilizada A/G-peroxidasa, se usó en dilución 1:20000, luego de probar varias diluciones de trabajo con leche de ovejas fuertemente positiva, débilmente positiva y negativa. El antígeno diluido en solución tampón carbonato sódico 0,06M (pH 9,6) fue pegado a placas de poliestireno (Nunc 2-69620, Dinamarca) a razón de 50 µl por celda e incubado por 18 h a temperatura ambiente, y luego lavado 5 veces con PBS-Tween 20, 0,05%, pH 7,2 (PBS/T). Se colocaron 50 µl leche, control y problema en una dilución 1:2 en PBS/T, conteniendo 15mM de EDTA/EGTA, y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Luego de 5 lavados en PBS/T se agregaron 50 µl por celda de conjugado proteína A/G-peroxidasa y se incubó durante una hora a temperatura

ambiente. Finalmente, luego de 5 lavados en PBS/T se agregó en cada celda 100 μ l de sustrato cromógeno (4,0 mM peróxido de hidrógeno y 1,0 mM ABTS en solución tampón citrato 0,05M, pH 4,5). La placa fue agitada en forma continua en agitador orbital y luego de 10 min se midió la densidad óptica a 400 nm en un lector de microplaca (Labsystems Multiskan EX), utilizando una placa con 100 μ l de sustrato cromógeno como control. La prueba es positiva cuando desarrolla color.

-IELISA –*B. ovis*:

El antígeno preparado de *B. ovis* cepa 11 como lo describió Vigliocco y col. (1997) fue suministrado por CNEA, Argentina y fue utilizado en dilución 1:2500.

El conjugado proteína liofilizada A/G-peroxidasa, fue utilizado en dilución 1:25000, luego de probar varias diluciones de trabajo con leche de ovejas fuertemente positiva, débilmente positiva y negativa.

El antígeno diluido en solución tampón carbonato sódico 0,06M (pH 9,6) fue pegado a placas de poliestireno (Nunc 2-69620, Dinamarca) a razón de 50 μ l por celda e incubado por 18 h a temperatura ambiente, y luego lavado 5 veces con PBS conteniendo Tween 20, 0,05%, pH 7,2 (PBS/T). Luego se colocaron 50 μ l de leche control y problema en una dilución 1:2 en PBS/T conteniendo 15mM de EDTA/EGTA, y se incubó la placa durante 1 h a temperatura ambiente. Luego de 5 lavados en PBS/T se agregaron 50 μ l por celda de conjugado proteína A/G-peroxidasa y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente luego de 5 lavados en PBS/T se agregó a cada celda 100 μ l de sustrato cromógeno (4,0 mM peróxido de hidrógeno y 1,0 mM ABTS). La placa se agitó en forma continua en agitador orbital y luego de 10 min se midió la densidad óptica en un lector de microplaca (Labsystems Multiskan EX) utilizando 100 μ l de sustrato cromógeno en una placa como control. La prueba es positiva cuando se desarrolla color.

Muestras

Las muestras de sangre y leche fueron recogidas simultáneamente. El suero fue separado y almacenado a -20°C hasta ser utilizado para realizar las pruebas serológicas. Todas las muestras de leche fueron extraídas luego de lavar y secar la ubre y desinfectar los pezones. Se descartó el primer chorro de leche y luego se recogieron aproximadamente 15 ml en un tubo estéril. Las muestras conservadas a 4°C fueron trasladadas al laboratorio. Para las pruebas de detección de anticuerpos, se separó 1 ml en cabina de seguridad biológica clase II, y se guardó a -20°C sin conservantes hasta el momento de su uso. Para los estudios bacteriológicos las muestras de leche se centrifugaron a 2000 x g durante 15 min. La crema y el sedimento fueron sembradas en forma separada en un medio basal con 3-5% de suero equino (libre de anticuerpos anti *B. ovis*) y antibióticos (vancomicina, 3 mg; sulfato-colistin-metano, 7,5 mg; nistatina 100000 unidades, nitrofurantoina 10 mg y cicloheximida 100 mg por litro) (Alton y col., 1988; OIE, 2000). Las placas fueron incubadas a 37°C en atmósfera con 10% de CO₂. Las cepas aisladas fueron tipificadas en el INEI-ANLIS (ver páginas 41-44) de acuerdo a las recomendaciones de Corbel y Morgan, (1984) y Alton y col. (1988).

Origen de las muestras

Setenta y cinco muestras de suero y leche fueron obtenidas de una majada no infectada localizada en un área del sudeste de la provincia de Buenos Aires, sin evidencia clínica, epidemiológica o bacteriológica de brucelosis, cuyos sueros resultaron negativos a las pruebas de RB, RSAT, IDGA, IELISA –*B. canis* e IELISA –*B. ovis*. Este grupo de animales fue utilizado para determinar la especificidad de IELISA –*B. ovis* e IELISA –*B. canis* en leche.

Veintitrés muestras de ovejas positivas fueron utilizadas para calcular la sensibilidad diagnóstica del IELISA –*B. ovis* e IELISA –*B. canis*, en leche.

Tres eran de un grupo de ovejas inoculadas experimentalmente vía EV, en el último tercio de la gestación con 1×10^6 UFC/ml de *B. ovis* aislada de un carnero infectado naturalmente. La leche y suero de estas tres ovejas en lactancia fueron suministradas por INTA Balcarce, Argentina.

Dos ovejas pertenecientes a una majada infectada naturalmente, que resultaron positivas a las pruebas serológicas (RSAT, IELISA –*B. canis*, IDGA, IELISA –*B. ovis*) y a las bacteriológicas.

Sesenta y cuatro ovejas procedentes de una majada localizada en la provincia de Buenos Aires, se consideraron sospechosas de estar infectadas, basándose en el examen clínico de algunos carneros.

Análisis de datos

Los valores de densidad óptica (DO) de IELISA en leche fueron comparados con aquellos controles de leche incluidos en cada placa de 96 hoyos. El porcentaje de positividad (%P) relativo fue calculado de acuerdo a la siguiente fórmula:
$$\%P = \left[\frac{DO_{414} \text{ muestra problema}}{DO_{414} \text{ leche control}} \right] \times 100.$$

La sensibilidad y especificidad diagnóstica fue determinada en forma inicial con un 95% de confianza, volcando los datos de las muestras positivas y negativas en un histograma de frecuencia. Los datos fueron luego analizados por la curva ROC (Schoonjans y col., 1995).

4. 3. Resultados

Los 144 sueros incluidos en este estudio fueron negativos a la prueba RB. El grupo de 75 sueros de ovejas de la majada libre de la infección fue negativo al RSAT, IELISA –*B. canis*, IDGA e IELISA –*B. ovis*. Las 75 muestras de leche de dichas ovejas, de las cuales no se aisló *Brucella*, tuvieron un valor promedio de (%P) IELISA –*B. canis* de 16,18 (DS 5,63) y un (%P) de 12,52 para IELISA –*B. ovis* (DS 4,94). Se determinó empíricamente el valor de corte de 27,44 (%P) (2DS) o 33 (%P) (3DS) con IELISA –*B. canis* y 22,4 (%P) (2DS) y 27,34 (%P) (3DS) para IELISA –*B. ovis*.

Estos valores de corte fueron ajustados por análisis de la curva ROC, utilizando 75 muestras negativas y 23 muestras positivas, resultando en un valor de corte para IELISA –*B. canis* de 33 (%P) y para IELISA –*B. ovis* de 26 (%P) con 100% de sensibilidad y especificidad. El gráfico 4 muestra los diagramas de puntos de IELISA –*B. canis* (A) e IELISA –*B. ovis* (B).

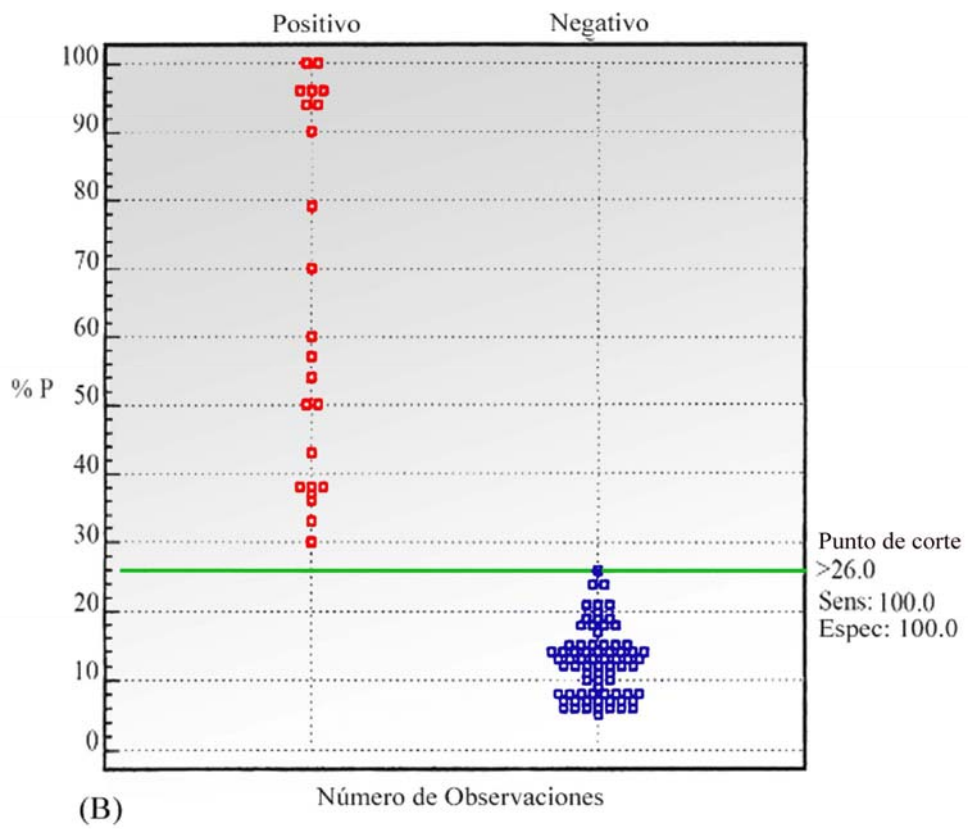
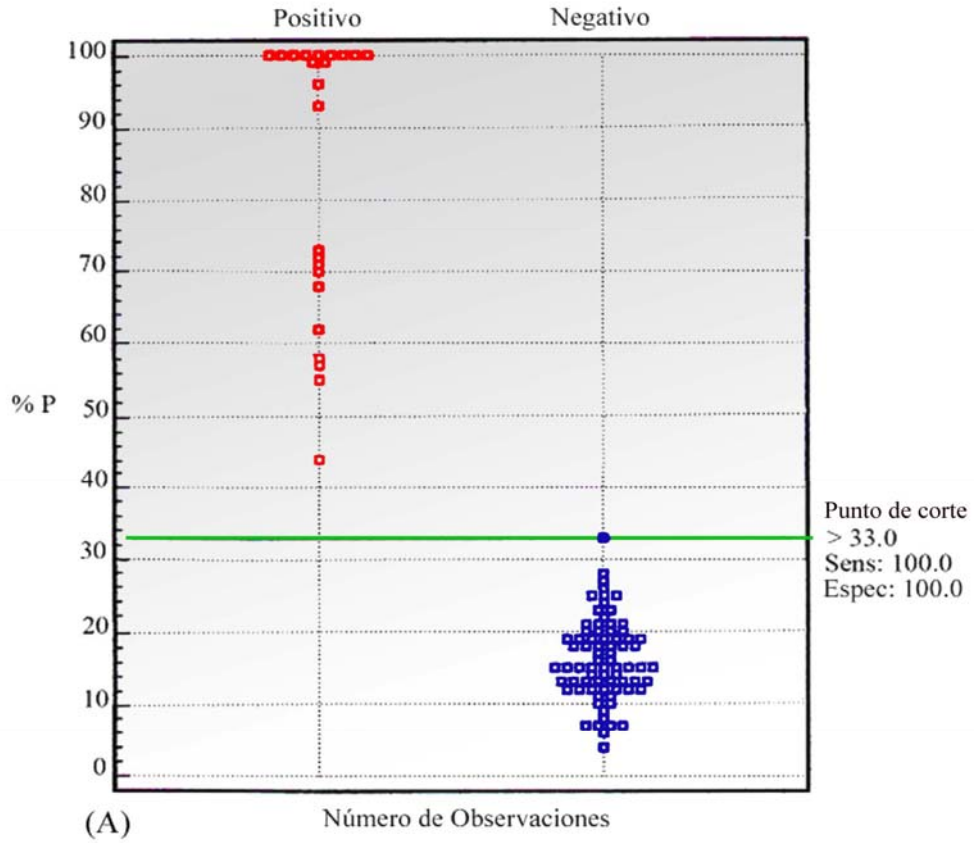


Gráfico 4: Diagrama interactivo de puntos de los resultados de IELISA-B.canis (A) e IELISA-B. ovis (B) en 98 muestras de leche [75 negativas y 23 positivas]

Los resultados de las pruebas realizadas en leche y suero de las ovejas infectadas se observan en la tabla 5. De la oveja número 2 sólo las cuatro últimas muestras fueron incluidas para el análisis de la curva ROC, ya que en ese momento los RSAT eran positivos y los IELISA en suero con ambos antígenos comenzaron a aumentar lentamente.

RSAT, IELISA –*B. canis* e IELISA –*B. ovis*, detectaron los 23 sueros positivos (100%) e IDGA 17 (73%). IELISA –*B. canis* e IELISA –*B. ovis* detectaron las 23 muestras de leche (100%).

En diez oportunidades se aisló *B. ovis* de las ovejas infectadas. Cuatro veces en la oveja uno, dos veces en la oveja tres, tres veces en la oveja cuatro y una en la oveja cinco.

De las 64 muestras de la majada sospechosa (datos no mostrados), 11 fueron detectados con IELISA –*B. canis* e IELISA –*B. ovis* en leche, tres y dos fueron positivos sólo con IELISA –*B. canis* e IELISA –*B. ovis* en suero respectivamente, 23 fueron negativas a todas las pruebas.

4. 4. Discusión

La brucelosis en rumiantes causada por *B. ovis* se caracteriza por producir reducción de la fertilidad en carneros y abortos y aumento de la mortalidad perinatal en ovejas.

El diagnóstico basado en el examen clínico no es suficientemente sensible y los estudios bacteriológicos son inadecuados para la detección de la enfermedad en un gran número de animales, razones por las cuales las pruebas serológicas son útiles para controles de rutina.

De los métodos serológicos utilizados para la detección de anticuerpos contra *B. ovis*, el IELISA ha mostrado ser el más sensible y específica, utilizando antígeno de *B. ovis* o *B. canis* (Lopez y col., 2005).

Oveja Nº.	Días desde la Primera muestra	Antígeno <i>B. canis</i>			Antígeno <i>B. ovis</i>			Aislamiento
		suero- RSAT	suero- IELISA	leche- IELISA	suero- IDGA**	suero- IELISA	leche- IELISA	
1*	0	Pos+/-	34	62	Neg	32	50	
	17	Pos+/-	44	70	Neg	43	70	
	25	Pos	72	100	Pos+++	49	90	<i>B. ovis</i>
	30	Pos	74	100	Pos+++	60	94	<i>B. ovis</i>
	37	Pos	73	100	Pos+++	65	94	
	44	Pos	68	100	Pos++	69	96	<i>B. ovis</i>
	51	Pos	65	100	Pos++	65	54	<i>B. ovis</i>
2*	0	Neg	37	29	Neg	44	17	
	17	Neg	36	20	Neg	43	12	
	25	Pos	36	22	Neg	42	13	
	30	Pos	38	57	Neg	48	36	
	37	Pos	56	58	Neg	68	37	
	44	Pos	68	55	Pos+++	63	50	
	51	Pos	65	68	Pos+++	53	79	
3*	0	Pos	52	44	Pos+++	89	30	
	17	Pos	50	72	Pos+++	66	33	
	25	Pos	64	71	Pos+++	98	38	
	30	Pos	85	73	Pos+++	100	38	
	37	Pos	94	93	Pos+++	95	38	<i>B. ovis</i>
	44	Pos	93	100	Pos+++	100	60	<i>B. ovis</i>
	51	Pos	88	99	Pos++	78	100	
4	0	Pos	100	99	Pos+++	100	96	<i>B. ovis</i>
	20	Pos	100	96	Pos+++	100	96	<i>B. ovis</i>
	45	Pos	88	100	Pos+++	100	100	<i>B. ovis</i>
5	0	Pos	100	100	Neg	89	43	<i>B. ovis</i>
	15	Pos	100	100	Neg	85	57	

*Inoculación experimental de ovejas vía EV con 1×10^6 UFC /ml de *B. ovis*

RSAT: Prueba de aglutinación rápida en placa

Pos: positivo

Neg: negativo

Pos+/-: débilmente positivo

suero-IELISA-*B. canis*: valor de corte (%P%) 39

suero-IELISA-*B. ovis*: valor de corte (%P) 51

IDGA: inmunodifusión en gel de Agar

**:(++, +++) Débil, moderadamente positivo

Tabla 5: Estudios bacteriológicos y pruebas para detectar anticuerpos anti *B. ovis* en leche y suero de 5 ovejas en lactancia.

Las pruebas de ELISA han demostrado ser igualmente efectivas para determinar anticuerpos anti *B. abortus* en leche y suero de bovinos y anti *B. melitensis* en leche y suero de ovinos (Heck y col., 1980; Alton y col., 1988; Nielsen y col., 1996; Chand y col. (2005a, b).

La leche es una muestra clínica de fácil obtención, económica, no invasiva y la etapa de lactancia no parecería influir en la prueba; sin embargo según nuestro conocimiento no ha sido investigada para el diagnóstico de brucelosis causada por *B. ovis*, pudiendo reflejar los niveles de anticuerpos en leche el estado serológico del animal (Lopez y col., 2006a,b).

En este trabajo se estudiaron 144 ovejas en lactancia, recolectando leche y sangre en forma simultánea.

Con las leches de 75 ovejas de la majada no infectada, cuyos sueros resultaron negativos con RSAT, IDGA, IELISA *-B. ovis* e IELISA *-B. canis* se determinó la especificidad, la cual resultó ser del 100%, con un valor de corte de 33 (%P) a IELISA *-B. canis* y 26 (%P) a IELISA *-B. ovis*, respectivamente (gráfico 4).

La sensibilidad fue calculada con 23 muestras de leche obtenidas de 5 ovejas positivas, las cuales fueron 100% a los IELISA en leche con ambos antígenos (Tabla 5).

Las 3 ovejas, primerizas, inoculadas experimentalmente con *B. ovis* parieron al séptimo día post inoculación y su suero y leche fueron muestreados en ocho oportunidades post parto. El suero y leche de la oveja número 3 fueron positivos desde la primera muestra. Las ovejas número 1 y 2 resultaron positivas a todas las pruebas 25 y 30 días post parto, respectivamente.

Cinco corderos paridos de estas tres ovejas fueron muestreados serológicamente en forma semanal a partir del mes de nacidos. Todos los sueros fueron negativos a RSAT, IDGA, IELISA *-B. canis* e IELISA *-B. ovis* y continuaron siendo negativos un mes más tarde. Esto coincide con lo reportado por Grillo y col. (1999) quienes encontraron que la mayoría de los corderos nacidos de hembras inoculadas experimentalmente en el último tercio de la preñez, eran negativos serológicamente.

Las ovejas número 4 y 5, naturalmente infectadas, fueron fuertemente positivas a todas las pruebas en suero y leche. La leche de la oveja número 4 tuvo un título de 1:600 con ambos IELISA (*B. canis* y *B. ovis*) y fue seleccionada como control

positivo, confirmando los informes previos (Lopez y col., 2005), donde los antígenos de *B. ovis* y *B. canis* dieron los mismos resultados. El suero de la oveja número 4 tuvo un título de 1:600, mientras que la oveja número 5 tuvo un título 1:200 con IELISA en leche y 1:800 con IELISA en suero.

De las 64 muestras de la majada sospechosa, (datos no mostrados) 23 y 17 fueron positivos a IELISA –*B. canis* en leche e IELISA –*B. ovis* en leche, respectivamente. Sin embargo, sólo tres fueron positivos a IELISA –*B. canis* en suero y dos a IELISA –*B. ovis* en suero. Esta diferencia podría atribuirse a la dilución del suero (1:50) y leche (1:2). Chand y col. (2005a,b) reportaron que los niveles de anticuerpos eran 5-10 veces más altos en suero que en leche en ovejas testeadas para el diagnóstico de infección para *B. melitensis*.

De las 3 ovejas infectadas experimentalmente, 2 fueron positivas a IELISA en leche pero no a IELISA en suero con ambos antígenos. Cuando los IELISA en leche resultaran positivos y los IELISA en sueros negativos, se debería tomar una nueva muestra a todas las ovejas sospechosas.

Cuando se compararon las pruebas de RSAT e IDGA como tamiz (tabla 5) esta última no fue lo suficientemente sensible. Los cuatro sueros positivos a IDGA, también positivos a RSAT (de la majada sospechosa), probablemente se debieron a una reacción falsa positiva, ya que resultaron negativos a las pruebas de IELISA en suero y leche.

Debido a que *B. ovis* comparte componentes antigénicos con *B. canis* ambas especies podrían ser usadas como antígenos con idénticos resultados; sin embargo, la ventaja de utilizar la variante *B. canis* (M-) es que no requiere el agregado de suero al medio basal ni CO₂ a la atmósfera durante la incubación (Lopez y col., 2006b).

Considerando que se ha notificado la correlación entre la concentración de IgG en leche y los niveles en suero (Caffin y col., 1983; Caffin y Poutrel, 1988; Smith y col., 1989) este tipo de muestra, fácil de tomar se podría utilizar en grandes majadas en épocas de lactancia.

En base a nuestros resultados se propone, luego de estudiar un mayor número de muestras, considerar la utilización del IELISA –*B. canis* en leche como una prueba conveniente para el diagnóstico de brucelosis por *B. ovis* en ovejas en lactancia.

5. CONCLUSIONES

La producción ovina es muy importante dentro del sistema agropecuario de Argentina. Aunque el ovino puede verse afectado por *B. melitensis* y *B. ovis*, nosotros hemos evaluado 369 sueros procedentes de distintas majadas con la prueba del RB, y no encontramos animales positivos, a especies lisas; esto coincide con lo publicado por García-Carrillo (1987) y Samartino (2002).

Si bien no hay un relevamiento nacional de la brucelosis ovina por *B. ovis*, se estima que la prevalencia varía entre un 4 y un 21% (Robles, 1998). Recientemente el SENASA autorizó la utilización de la vacuna Rev. 1 en caprinos (Resolución 216/2006) pero no está autorizado su uso en ovinos. Debido al impedimento de contar por el momento con esta herramienta de control, se recomienda adoptar las siguientes medidas:

- Eliminar sistemáticamente a los carneros con epididimitis clínica.
- Realizar pruebas serológicas para detectar animales positivos (incluyendo los retajos) y examen del semen de todos los carneros como alternativa conjunta. El período óptimo para realizar dichas pruebas sería de 30 días antes del servicio y 30 a 45 días luego de finalizado el mismo, eliminando aquellos animales positivos. De ser posible el control debería incluir machos y hembras, pero en aquellos casos donde no se puede efectuar en todos los animales (impedimento económico, elevado número de animales, falta de instalaciones adecuadas y/o personal, etc.) controlando solo a los machos se podría eliminar la enfermedad luego de varios ciclos reproductivos.
- Evaluación serológica de todos los carneros que se introduzcan al establecimiento provenientes de cabañas u otras majadas. Recordando que se deberían efectuar dos pruebas serológicas con un intervalo de 30 días.

- En el caso de identificar animales sospechosos, se los debería aislar y sangrar nuevamente a los 60 días, eliminando los positivos.

- Evitar el contacto de carneros adultos con borregos, especialmente durante la época de servicio. En este sentido se debería dar servicio a las borregas de reposición con carneros jóvenes, vírgenes.

- En majadas destinadas a la producción láctea, sería recomendable efectuar el control al principio y final de la lactancia.

La producción ovina en la Argentina se realiza mayoritariamente en forma extensiva o semintensiva. Por ello se requiere la utilización de técnicas efectivas y sencillas para controlar la brucelosis ovina.

Por este motivo se evaluaron distintas alternativas diagnósticas, llegando a las siguientes conclusiones:

1. Los datos presentados indican claramente que RSAT en suero e IELISA en suero y leche, con antígeno de *B. canis* son técnicas útiles y prácticas para controlar y erradicar la enfermedad.

2. El antígeno para la prueba de microaglutinación RSAT, preparado con la cepa *B. canis* M-, de características mucoides tiene la ventaja de ser estable, no necesita la adición de suero al medio de cultivo para su crecimiento, ni el agregado de CO₂ a la atmósfera de incubación, facilitando su utilización en la preparación de antígenos. La prueba de RSAT podría ser evaluada como tamiz, por ser sensible, rápida y fácil de realizar.

3. Las IELISAs con antígeno *B. ovis* y *B. canis* resultaron tener una sensibilidad y especificidad del 100% en el diagnóstico serológico de brucelosis ovina causada por *B. ovis*, pero el antígeno preparado con *B. canis* tiene la ventaja señalada en el punto 2.

4. La leche es una muestra de fácil obtención, no invasiva y poco costosa que facilita la relación con el propietario y la prueba de IELISA, tanto con antígeno *B. ovis* como *B. canis*, ha demostrado tener una sensibilidad y especificidad del 100% para el diagnóstico de *B. ovis* en ovejas en lactancia.

5. La proteína recombinante A/G que se utilizó en los dos experimentos demostró alta sensibilidad, y ha sido propuesta por Nielsen y col. (2005) como reactivo universal en IELISA para el diagnóstico de brucelosis en distintas especies.

6. La IDGA demostró una sensibilidad menor que las IELISA con ambos antígenos.

6. BIBLIOGRAFÍA

- **Acosta Dibarrat, J., Díaz Aparicio, E., Arellano Reynoso, B., Tenorio Gutiérrez, V., Tórtora Pérez, J.** 2006. Inducción experimental de epididimitis en ovinos por inoculación intrauretral con *Actinobacillus seminis*: estudio bacteriológico, serológico e histopatológico. Tec. Pecu. Méx. 44(2):257-267.
- **Acosta, L., Biran, O.** 1950. Primeras observaciones sobre brucelosis en cerdos faenados en el matadero de Corrientes. Rev. Med. Vet. 32:127-128.
- **Afzal, M., Tengerdy, R., Squire, P., Ellis, R.** 1984. Characterization of *Brucella ovis* lipopolysaccharide and its use for diagnosis of ram epididymitis by enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol. 20:1159-1164.
- **Afzal, M. and Kimberling, C.V.** 1986. How to control *Brucella ovis*-induced epididymitis in rams. Vet. Med. 81:364-370.
- **Ajai, C.O., Cook, J.E., Dennis, S.M.** 1980. Diagnosing ovine epididymitis by immunofluorescence. Vet. Rec. 107:421-424.
- **Alton, G.G.; Jones, L.M; Angus, R.D.; Verger, J.M.** 1988. Serological methods. Techniques for the Brucellosis laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France, pp. 157-167.
- **Anderson, T.D. and Cheville, N.F.** 1986. Ultrastructural morphometric analysis of *Brucella abortus*-infected trophoblasts in experimental placentitis. Am. J. Pathol. 124:226-237.
- **Anderson, T.D., Meador, V.P. and Cheville, N.F.** 1986. Pathogenesis of placentitis in the goats inoculated with *B. Abortus*. I. Gross and histologic lesions. Vet. Pathol. 23:219-232.
- **Arese, A., Gregoret, R., Samartino, L., Cravero, S., Boschioli, M., Campos, E., Rossetti, O.** 1997. Uso de una proteína recombinante de *Brucella abortus* para el diagnóstico serológico de brucelosis en ovinos. En: 25º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. Gramado, Río Grande do Sul. Brasil, pp. 156.
- **Arese, A., Blasco, J.M., Cravero, S., Campos, E., Rossetti, O.** 2004. Evaluación de un IELISA como método alternativo para el diagnóstico de

brucelosis en pequeños rumiantes. IV Congreso Argentino de Zoonosis. Libro de resúmenes. pp. 54.

- **Arsenault, J., Girard, C., Dubreuil, P., Blanger, D.** 2004. Lack of evidence of *Brucella ovis* infection in rams in Quebec. *Can. Vet. J.* 45(4): 312-314.
- **Asad, A.** 2006. Dirección Nacional de Alimentos. Sector carnes. www.alimentosargentinos.gov.ar
- **Badiola, J.J., Barberán, M., García de Jalon, J.A., Bascuas, J.A.** 1981. Características reproductivas de moruecos Romanov, afectados de epididimitis infecciosa. III. Alteraciones anatomopatológicas. VI Jornadas de la S.E.O. Junio 1981. Talavera de la Reina.
- **Bakurjiev, K. and Krustev, H.** 1976. Autophagocytosis of spermatozoa in rams with a *Brucella ovis* infection. *Vet. Med. Nauki.* 13:44-51.
- **Bakurjiev, K. and Krustev, H.** 1977. Ultrastructural changes in the spermatozoa of rams infected with *Brucella ovis*. *Vet. Med. Nauki.* 14:3-12.
- **Baldi, P.C., Wanke, M.M., Loza M.E., Fossati, C.A.** 1994. *Brucella abortus* cytoplasmic proteins used as antigens in an ELISA potentially useful for the diagnosis of canine brucellosis. *Vet. Microbiol.* 41(1-2):127-134.
- **Baldock, F.C.** 1988. Epidemiological evaluation of immunological tests. In Burgess, G., (Ed.) *ELISA Technology in Diagnosis and Research* James Cook University of North Queensland Townsville, Australia.
- **Beherens, H.** 1979. *Lehrbuch der schafkrankheiten.* Verlag Paul Parey. Berlin-Hamburg, pp.57-59/178-181.
- **Bercovich, Z. and Taaijke, R.** 1990. Enzyme immunoassay using mouse anti-bovine antibodies for the detection of *Brucella abortus* antibodies in cow milk. *J. Vet. Med. B.* 37:753-759.
- **Bercovich, Z., Güler, L, Baysal, T., Scheuder, B., van Zijderveld, F.G.** 1998. Evaluation of the currently used diagnostic procedures for the detection of *Brucella melitensis* in sheep. *Small Ruminant Research.* 31:1-6.
- **Biancifiori, F., Nannini, D., Di Matteo, A., Belfiore, p.,** 1996. Assessment of an indirect ELISA in milk for the detection of ovine brucellosis. *Comp. Immunol. Infect. Dis.* 19: 17-24.

- **Biberstein, E.L. McGowan, B.** 1958. Epididymitis in rams. Studies on laboratory diagnosis. Cornell Vet. 48:31-44.
- **Biberstein, E.L., McGowan, B., Olander, H., Kennedy, P.C.** 1964. Epididymitis in rams. Studies on pathogenesis. Cornell Vet. 54:27-41.
- **Blank, O., Retamal, P., Abalos, P., Torres, D.** 2002. Detección de anticuerpos Anti-*Brucella* en focas de Weddell (*Leptonychotes weddellii*) de Cabo Shirreff, Antártica. Arch. Med. Vet. 34(1):117-122.
- **Blasco Martínez, J.M.** 1983. Epididimitis Contagiosa del Morrueco (Infección por *Brucella ovis*). Revisión bibliográfica. Anales INIA. Serie Higiene y Sanidad Animal.
- **Blasco, J.M., Marín, C.M., Barberán, M., Moriyón, I., Díaz, R.** 1987. Immunization with *Brucella melitensis* Rev. 1 against *Brucella ovis* infection of rams. Vet. Microbiol. 14:381-392.
- **Blasco, J.M.,** 1990a. *Brucella ovis*. In: Nielsen, K., Duncan, J.R. (Eds.). Animal Brucellosis. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 351-378.
- **Blasco, J.M.** 1990b. Brucellosis ovina: Estado actual en España. Ovis.8:9-12.
- **Blasco, J.M. y Barberán, M.** 1990. Brucelosis ovina: epidemiología, patogenia y cuadro clínico. Ovis, 8: 25-32.
- **Blasco, J.M. y Jiménez de Bagues, M.P.** 1990. Brucelosis ovina: diagnóstico serológico. Ovis, 8: 51-64.
- **Blasco, J.M., y Marín, C.M.** 1990. Brucellosis ovina: Diagnóstico serológico. Ovis.8:15-22.
- **Blasco, J. y Gamazo, C.** 1994. Brucelosis animal. Investigación y ciencia. 218:56-62.
- **Blasco, J.M.** 2001. Brucelosis animal: La enfermedad y medidas para su control y erradicación, pp.31-43. In: Manual de Brucelosis. Editado por Rodríguez Torres y col. Junta de Castilla y León. Consejería de Sanidad y Bienestar Social.
- **Boletín ovino.** 2006. Departamento de Ovinos y Lanos. SAGPyA. www.sagpya.mecon.gov.ar.
- **Bonino, J., Cavestany, D., Sienna, R.** 1987. Circunferencia escrotal en carneros según raza, edad, peso y época del año e incidencia de

- Brucelosis genital. En: Enfermedades de los lanares. Bonino Morlan J. y col. Ed. Hemisferio Sur. Montevideo, Uruguay. Tomo III: 192-207.
- **Bonino, J., Sienna, R.** 1987. Aborto ovino. En: Enfermedades de los lanares. Bonino Morlan J. y col. Ed. Hemisferio Sur. Montevideo, Uruguay. Tomo III, pp. 113-141.
 - **Bonino, J., Casaretto, A., Castells, D., Martínez Gomila, E.** 1992. Apuntes de lanares y lanas. Sanidad. Secretariado Uruguayo de la lana, pp. 2.
 - **Bonino, J., Cavestany, D.** 2005. Aspectos de pérdidas reproductivas de origen infeccioso en ovinos. Producción ovina. Secretariado Uruguayo de la Lana. 17:69 -76.
 - **Borie, C., Cepeda, R., Villarroel, M., De Los Reyes, M.** 2002. Descripción de características reproductivas en tres perros seropositivos a *B. canis*. Arch. Med. Vet. Vol. XXXIV N° 1, pp. 111-116.
 - **Boschiroli, M.L., Ouahrani-Bettache, S., Foulongne, V., Michaux-Charachon, S., Bourg, G., Allardet-Servent, A., Cazevieille, C., Liautard, J.P., Ramuz, M., O'Callaghan, D.** 2002. The *Brucella suis virB* operon is induced intracellularly in macrophages. Proc Natl Acad Sci USA. 99:1544-1549.
 - **Bowden, R.A., Cloeckaert, A., Zygmunt, M.S., Bernard, S., Dubray, G.** 1995a. Surface exposure of outer membrane protein and lipopolysaccharide epitopes in *Brucella* species studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry. Infect. Immun. 63:3945-3956.
 - **Bowden, R.A., Cloeckaert, A., Zygmunt, M.S., Bernard, S., Dubray, G.** 1995b. Outer membrane protein and rough lipopolysaccharide specific monoclonal antibodies protect mice against *Brucella ovis*. J. Med. Microbiol. 43:344-347.
 - **Bowden, R.A., Verger, J.M., Grayon, M., Cloeckaert, A.** 1997. Rapid identification of rough *Brucella* isolates by a latex coagglutination assay with the 25-kilodalton outer membrane protein and rough-lipopolysaccharide-specific monoclonal antibodies. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 4:611-614.
 - **Brown, G.M., Pietz, D.E., Price, D.A.** 1973. Studies on the transmission of *Brucella ovis* infection in rams. Cornell Vet. 63:29-40.

- **Buddle, M.B.** 1955. Observations on the transmission of *Brucella* infection in sheep. N. Z. Vet. J. 3:10-19.
- **Buddle, M.B.** 1956. Studies of *Brucella ovis*, as cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia. J. Hyg. 54 (3):351-366
- **Buddle, M.B., Boyes, B.W.** 1953. A *Brucella* mutant causing genital disease of sheep in New Zealand. Aust. Vet. J. 29:145-153.
- **Bulgin, M.S.** 1990. Epididymitis in Rams and Lambs. Veterinary clinics of North America: Food Animal Practice. 6:683-690.
- **Burgess, G.W.** 1982. Ovine contagious epididymitis: a review. Vet. Microbiol. 7: 551-575.
- **Burgess, G.W. and Norris, M.J.** 1982. Evaluation of the cold complement fixation test for diagnosis of ovine brucellosis. Aust. Vet. J. 59:23-25.
- **Caffin, J.P. and Poutrel, B.,** 1988. Physiological and pathological factors influencing bovine immunoglobulin G₂ concentration in milk. J. Dairy Sci. 71:2035-2043.
- **Caffin, J.P., Poutrel, B., Rainard, P.,** 1983. Physiological and pathological factors influencing bovine immunoglobulin G₁ concentration in milk. J. Dairy Sci. 66: 2161-2166.
- **Cameron, R.D.A. and Lauerman, Jr., L.H.** 1976. Characteristics of semen changes during *Brucella ovis* infection in rams. Vet. Rec. 99:231-233.
- **Cameron, R.D.A., Carles, A.B. and Lauerman, Jr., L.H.** 1971. The incidence of *Brucella ovis* in some Kenya flocks and its relationship to clinical lesions and semen quality. Vet. Rec. 89:552-557.
- **Canning, P., Roth, J.A., Deyoe, B.L.** 1986. Release of 5'-guanosine monophosphate and adenine by *Brucella abortus* and their role in the intracellular survival of the bacteria. J. Infect. Dis. 154(3):464-470.
- **Cannon, R.M., Roe, R.T.** 1982. Livestock disease surveys: a field manual for veterinarians. Austral Govt Publish Sew, Canberra. ISBN 0-644-02101-2.
- **Carmichael, L.E., Joubert, J.C.** 1987. A rapid slide agglutination test for the serodiagnosis of *Brucella canis* infection that employs a variant (M-) organism as antigen. Cornell Vet. 77:3-12.

- **Castro, H.A., Gonzalez, S.R., Prat, M.I.** 2005. Brucellosis: una revisión practica. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 39 (2):203-16.
- **Cerri, D., Ebani, V., Pedrini, A., Nuvolini, R., Renzoni, G., Andreani, E., Farina, R.** 1999. Epididymitis by *Brucella ovis*: experimental infection in virgen rams lambs. *New Microbiol.* 22(3):227-231.
- **Cerri, D., Ebani, V.V., Pedrini, A., Bassi, S., Bey R.F., Andreani, E., Farina, R.** 2000 Evaluation of tests employed in serological diagnosis of brucellosis caused by *Brucella ovis*. *New Microbiol.* 23(3):281-288.
- **Chain, P.S., Comerci, D.J., Tolmasky, M.E., Larimer, F.W., Malfatti, S.A., Vergez, L.M., Aguero F., Land, M.L., Ugalde, R.A., García, E.** 2005. Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic Brucellae. *Infect. Immun.* 73(12):8353-8361.
- **Chand, P., Sadana, J.R., Malhotra, A.K., Poonia, J.S.** 2004. Indirect ELISA for the detection of antibodies to *Brucella melitensis* in sheep milk. *Vet. Rec.* 155: 639-641.
- **Chand, P., Rajpurohit, B.S., Malhotra, A.K., Poonia, J.S** 2005a Comparison of milk-ELISA and serum-ELISA for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep milk. *Vet. Microbiol.* 108:305-311.
- **Chand, P., Rajpurohit, B.S., Malhotra, A.K., Poonia, J.S.** 2005b Comparison of milk-ELISA and serum-ELISA for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep milk. *Vet.Rec.* 155:639-641.
- **Chin, J.C., Plant, J.W., Claxton, P.D.** 1983. Evaluation of surface components of *Brucella ovis* as antigens for the detection of precipitin antibody in serums from artificially exposed rams. *Aust. Vet. J.* 60:264-267.
- **Chin, J.C., Pang, B., Carrigan, M.** 1991. Comparison of seroreactivity of rams with brucellosis in a complement fixation test, whole cell ELISA and by immunoblouting. *Vet. Microbiol.* 26:291-299.
- **Cho, H.J., Niilo, L.** 1987. Diagnostic sensitivity and specificity o fan enzyme-linked immunosorben for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *Can. J. Vet. Res.* 51(1):99-103.
- **Cloekaert, A., Zygmunt, M.S., De Wergifosse, P., Dubray, G., Limet, J.N.** 1992. Demonstration of peptidoglycan-associated *Brucella* outer-

- membrane proteins by use of monoclonal antibodies. *J. Gen. Microbiol.* 138:1543-1550.
- **Cloeckaert, A., Verger, J.M., Grayon, M., Zygmunt, M.S., Grépinet, O.** 1996. Nucleotide sequence and expression of the gene encoding the major 25-kilodalton outer membrane protein of *Brucella ovis*: evidence for antigenic shift, compared with other *Brucella* species, due to a deletion in the gene. *Infect. Immun.* 64:2047-2055.
 - **Cloeckaert, A., Tibor, A., Zygmunt, M.S.** 1999. *Brucella* outer membrane lipoproteins share antigenic determinants with bacteria of the family Rhizobiaceae. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6(4):627-629.
 - **Comerci, D.J., Martinez-Lorenzo, M.J., Sieira, R., Gorvel, J.P., Ugalde, R.A.** 2001. Essential role of the *virB* machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole. *Cell Microbiol.* 3:159-168.
 - **Corbel, M.J., Gill, K.P.W., and Redwood, D.W.** 1978. Methods for the identification of *Brucella*. Central Veterinary Laboratory. Ministry of Agriculture, Fisheries and Foods. New Haw. Weybridge. Surrey. U.K. Booklet 2085.
 - **Corbel, M.J. and Morgan, B. W.J.** 1984. Genus *Brucella*. In: "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology". Williams & Wilkins. Baltimore, London. IX Edit. 1:377-388.
 - **Corbel, M.J.** 1997. Recent advances in Brucellosis. *J. Med. Microbiol.* 46:101-103.
 - **Crespo León, F.** 1994. Brucelosis ovina y caprina. Office International des Epizooties. París, Francia.
 - **Cuba-Caparo, A. and Myers, D.M.** 1973. Pathogenesis of epididymitis caused by *Brucella ovis* in laboratory animals. *Am. J. Vet. Res.* 34:1077-1085.
 - **De Gea, G.S.** 2004. El Ganado Lanar en la Argentina. 1º Edición. Río Cuarto. Edit. U.N.R.C. Cap.I. www.produccion-animal.com.ar
 - **Detilleux, P.G., Deyoe, B.L. and Cheville, N.F.** 1990. Entry and intracellular localization of *Brucella* sp. In vero cells: fluorescence and electron microscopy. *Vet. Pathol.* 27:317-328.

- **Díaz, R.** 1974. Valoración de la prueba del Rosa de Bengala y la demostración de anticuerpos antiproteína de *Brucella* en el diagnóstico serológico de brucelosis y yersiniosis. *Medicina Clínica*. 63:463-466.
- **Díaz, R. y Bosseray, N.** 1974. Estudio de las relaciones antigénicas entre *Yersinia enterocolitica* serotipo 9 y otras especies bacterianas gram-negativas. *Microbiol. España*. 27:1-14.
- **Díaz, R. y Blasco, J.M.** 1986. Diagnóstico inmunológico. *Ovis*. 9:55-69.
- **Díaz, R. y Blasco, J.M.** 1989. Diagnóstico serológico de la brucelosis en rumiantes. III. Master Internacional de Atención al Medio. Instituto de Salud Pública. Pamplona. Navarra.
- **Díaz, R., Blasco, J.M.** 1994. Diagnóstico inmunológico de la brucelosis bovina. *Ovis*. 57:59-77.
- **Direnko, P.M. and Rudenko, A.F.** 1976. Experimental *Brucella ovis* infection in sheep. *Veterinariya, Kiev*. 44:26-31.
- **Draghi, M.G., Zurbriggen, M.A., Rochinotti, D., Vanzini, V.R., Homse A.C., Baez Kohn A.R.** 1984. Brucelosis ovina: Estudio serológico en 6 departamentos de la provincia de Corrientes, Argentina. *Vet. Argentina*. 1:39-43.
- **Dubray, G.** 1985. Antigens of diagnosis significance in *Brucella*. In "Brucella melitensis". J.M. Verger & M. Plommet. Martinus Nijhoff Publishers for CEE. The Hague:123-138.
- **Dubray, G. and Limet, J.** 1987. Evidence of heterogeneity of Lipopolysaccharides among *Brucella* biovars in relation to A and M specificities. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol*. 138:27-37.
- **Ebani, V.V., Cerri, D., Bey, R.F., Andreani, E., Farina, R.** 2000. An immunoblotting technique for the serodiagnosis of brucellosis by *Brucella ovis*. *New Microbiol*. 23:55-62.
- **Elberg, S.S.** 1981. *Brucella melitensis* vaccine. Part II 1968-1980. *Vet. Bull*. 51:67-73.
- **Eliasson, M., Olsson, A., Palmcrantz, E., Wiberg, K., Inganas, M., Guss, B., Lindberg, M., Uhlen, M.** 1988. Chimeric IgG-binding receptors from staphylococcal Protein A and streptococcal Protein G. *J. Biol. Chem*. 263:4323-4327.

- **Estein, S.** 1999. Aspectos inmunológicos en el diagnóstico y control de la Epididimitis contagiosa del carnero por *Brucella ovis*. Arch. Med. Vet. 31(1):5-17.
- **Estein, S.M., Baldi, P.C., Bowden, R.A.** 2002. Comparison of serological tests based on outer membrane or internal antigens for detecting antibodies to *Brucella ovis* in infected flocks. J. Vet. Diagn. Invest. 14:407-411.
- **Estein, S.M.** 2006. Brucelosis: Inmunidad y vacunación (revisión bibliográfica). Rev. Electrónica de Vet. Vol. VII, nº 5. www.veterinaria.org/revistas/redvet
- **Ewalt, D., Payeur, J., Martin, B., Cummins, D., Miller, G.** 1994. Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*T. truncatus*). J. Vet. Diagn. Invest. 6:448-452.
- **FAO (Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations).** 2005. www.fao.org
- **Fensterbank, R., Pardon, P., Marly, J.** 1982. Efficacy of *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine against *Brucella ovis* infection in rams. Ann. Rech. Vet. 13:185-190.
- **Fensterbank, R.** 1984. Le diagnostic allergique des brucelloses animales. Standard. 56:401-405.
- **Ficapal, A., Alonso-Urmeneta, B., Velasco, J., Morrión, I., Blasco, J.M.** 1995. Diagnosis of *Brucella ovis* infection of rams with an ELISA using protein G as a conjugate. Vet. Rec. 137:145-147.
- **Ficapal, A., Jordana, J., Blasco, J.M., Moriyón, I.** 1998. Diagnosis and epidemiology of *Brucella ovis* infection in rams. Small Ruminant Research. 29:13-19.
- **FLA (Federación Lanera Argentina).** 2006. www.flasite.com
- **Folch, J., Blasco, J.M., Uriarte, J.** 1981. Características reproductivas de moruecos Romanov, afectados de epididimitis infecciosa. II. Alteraciones seminales. VI Jornadas de la S.E.O. Junio 1981. Talavera de la Reina.
- **Foster, R.A., Ladds, P.W., Briggs, G.D., Hoffmann, D.** 1987. Pathology of the accessory sex glands of rams infected with *Brucella ovis*. Aust. Vet. J. 64:248-250.

- **Foster, R.A., Ladds, P.W., Hoffmann, 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. Aust. Vet. J. 65:324-326.
- **Funk, N.D., Tabatabai, L.B., Elzer, P.H., Hagijs, S.D., Martin, B.M., Hoffman, L.** 2005. Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of *Brucella melitensis*-Specific Antibodies in Goat Milk. J. Clín. Microbiol. 43(2):721-725.
- **Gaffuri, A., Garbarino, C.** 1999. Piano regionale di controllo ed eradicazione della *Brucella ovis*. www.oevr.org
- **Galanos, C., Luderitz, O., Westphal, O.** 1969. A new method for extraction of R lipopolysaccharide. Eur. J. Biochem. 9(2):245-249.
- **Gall, D., Nielsen, K., Vigliocco, A., Smith, P., Perez, B., Rojas, X., Robles, C.** 2003. Evaluation of indirect enzyme-linked immunoassay for presumptive serodiagnosis of *Brucella ovis* in sheep. Small Ruminant Research. 48:173-179.
- **Gamazo, C., Winter, A.J., Moriyón, I., Riezu-Boj, J.I., Blasco, J.M., Díaz, R.** 1989. Comparative analyses of proteins extracted by hot saline or released spontaneously into outer membrane blebs from field strains of *Brucella ovis* and *Brucella melitensis*. Infect. Immun. 57:1419-1426.
- **García-Carrillo, C., Casas Olascoaga, R., Cuba-Caparo, A., Lucero, N., Szyfres, B.** 1977. Experimental infection of male goats with *Brucella ovis*. Bacteriological, serological and histopathological study. Rev. Microbiol. 9(3):101-108.
- **García-Carrillo, C.** 1987. La Brucelosis de los animales en América y su relación con la infección humana. Office International des Epizooties. París, Francia.
- **Garin-Bastuji, B.** 1992. Reliability of serological test in the diagnosis and control of brucellosis with regard to species and herd prevalence. Expert Consultation Meeting on Strategies in Diagnosis and Control of Brucellosis in Asia. Beijing, China. 5 to 9 october, 1992.

- **Gavrilov, P., Bzhevskaya, A., Rementsova, M., Usmanova, F., Postricheva, O.** 1972. Epidemiology of disease caused by *Brucella ovis*. Veterinariya. 7:55-57.
- **Giauffret, A., Sanchis, R., Gaumont, R.** 1972. Epididymite contagieuse dubelier a *B. ovis* dans le Sud-est de la France. Bull Acad. Vet. 45 :469-473.
- **Giauffret, A. and Sanchis, R.** 1974. Etude d'un foyer d'Epididymite contagieuse du bélier. Erradication de la maladie. Bull. Off. Int. Epiz. 82:581-586.
- **Gorvel, J.P., Moreno, E.** 2002. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. Vet. Microbiol. 90:281-297.
- **Grillo, M.J., Jiménez de Bagués, C.M., Marín, M. Blasco, J.M., Barberán, M.** 1995. Infección experimental por *Brucella ovis* en ovejas gestantes. Memorias de las VI Jornadas sobre producción animal. Setiembre, 1995. Universidad Complutense. Madrid, España, pp. 539-541.
- **Grillo, M.J., Marín, C., Barberán M., Balsco, J.M.** 1999. Experimental *Brucella ovis* infection in pregnant ewes. Vet. Rec. 144(20):555-558.
- **Hajdu, S.** 1962. Serological investigation and control of infectious epididymitis and ovine brucellosis in Slovakia. Arch. Exp. Vet. Med. 16:19-28. In: Vet. Bull. 32:664.
- **Hardefeldt, K.W.** 1977. Field investigations into the diagnosis of some infectious causes of epididymitis in rams. Victorian Vet. Proc. 35:28-29.
- **Hartley, W.J., Jebson, J.L., McFarlane, D.** 1955. Some observations on natural transmission of ovine brucellosis. N.Z. Vet. J. 3:5-10.
- **Haughey, K.G., Hughes, K.L.** 1969. The apparent failure of a vaccine to protect rams against naturally occurring *Brucella ovis* infection. Aust. Vet. J. 45:10-12.
- **Heck, F. C., Williams, J.D., Sanders, R., Zink. D.L.,** 1980. Enzyme linked immunosorbent assay for detecting antibodies to *Brucella abortus* in bovine milk and serum. Am. J. Vet. Res. 41: 2082-2084.
- **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.

- **Homse, A., Casaro, A., Campero, C.** 1995. Infertilidad en ovejas por *Brucella ovis*. Veterinaria Argentina. 12:243-249.
- **Hoover, D.L. and Friedlander, M.D.** 1997. Brucellosis, pp. 513-520 (Chapter 25). En: Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare. Ed. Lorraine, B.D. Published by the Office of the Surgeon General at TMM Publications. Borden Institute. Walter Reed Army Medical Center, Washington.
- **Hughes, K.L. and Claxton, P.D.** 1968. *Brucella ovis* infection. 1. An evaluation of microbiological, serological and clinical methods of diagnosis in the ram. Aust. Vet. J. 44:41-47.
- **Hughes, K.L.** 1972a. Experimental *Brucella ovis* infection in ewes. 1. Breeding performance of infected ewes. Aust. Vet. J. 48:12-17.
- **Hughes, K.L.** 1972b. Experimental *Brucella ovis* infection in ewes. 2. Correlation of infection and complement fixation titres. Aust. Vet. J. 48:18-22.
- **INDEC.** 2002. Instituto Nacional de Estadística y Censos. República Argentina. Censo Nacional Agropecuario. www.indec.gov.ar.
- **Jansen, B.C.** 1980. The pathology of bacterial infections of the genitalia in rams. Onderstepoort J. Vet. Res. 47:263-267.
- **Jiménez de Bagués, M.P., Marín, C.M., Barberán, M., Blasco, J.M.** 1993. Evaluation of vaccines and antigen therapy in a mouse model for *Brucella ovis*. Vaccine. 11:61-63.
- **Jiménez de Bagués, M.P., Elzer, P.H., Blasco, J.M., Marín, C.M., Gamazo, C., Winter, A.J.** 1994. Protective Immunity to *Brucella ovis* in BALB/c mice following recovery from primary infection or immunization with subcellular vaccines. Infect. Immun. 62:632-638.
- **Jones, L.M., Dubray, G., Marley, J.,** 1975. Comparison of methods of diagnosis of *Brucella melitensis*. Ann. Rech. Vet. 6: 11-12.
- **Jumas-Bilak, E., Michaux-Charachon, S., Bourg, G., O'Callaghan, D., Ramuz, M.** 1998. Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus *Brucella*. Mol. Microbiol. 3:99-106.
- **Kennedy, P.C., Frazier, L.M., McGowan, B.** 1956. Epididymitis in rams: Pathology and bacteriology. Cornell Vet. 46:303-319.

- **Kerkhofs, P., Botton, Y., Thiange, P., Dekeyser, P., Limet, J.N.,** 1990. Diagnosis of bovine brucellosis by enzyme immunoassay of milk. *Vet. Microbiol.* 105: 181-187.
- **Kimberling, C.V. & Schweitzer, D.** 1989. *Brucella ovis* infection and its management in ovine reproduction. *Agri-Practice.* 10:36-39.
- **Kittelberger, R., Hansen, M., Ross, G.P., Hilbink, F.** 1994. A sensitive immunoblotting technique for the serodiagnosis of *Brucella ovis* infections. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6:188-194.
- **Kittelberger, R., Diack, D.S., Vizcaino, N., Zygmunt, M.S., Cloeckaert, A.** 1998. Characterization of an immuno-dominant antigen in *Brucella ovis* and evaluation of its use in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet. Microbiol.* 59:213-227.
- **Kolar, J.** 1984. Diagnosis and control of brucellosis in small ruminants. *Prev. Vet. Med.* 2:215-225.
- **Komissarova, L.I.** 1973. Pathological changes in rams and breeding ewes, infected with *Brucella ovis*. *Shornik Rabot. Leningrad. Veter. Instit.* 34:80-84.
- **Ladds, P.W.** 1985. The male genital systems. En: *Pathology in domestic animals.* Ed. Jubb, K.V.F. Kennedy, P.C. and Palmer, N. Academic Press, Orlando. Vol. III, 3^o edición, pp. 409-453.
- **Lawrence, W.E.** 1961. Ovine Brucellosis: a review of the disease in sheep manifested by epididymitis and abortion. *British Veterinary Journal.* 117: 435-447.
- **Libal, M.** 1990. Laboratory diagnosis of livestock abortion. Ovine abortion caused by *Brucella ovis*. 3^o ed. Iowa State University press. USA, pp. 27-29.
- **López Merino, A., Migranas Ortiz, R., Perez Miravete, A., Magos, C., Salvatierra Izaba, B., Tapia Coyner, R., Valdespino, J.L., Sepulveda, J.** 1992. Seroepidemiología de la Brucelosis en México. *Salud Pública de México.* Vol. 34, N^o 2:1-14. www.insp.mx/salud.
- **Lopez, G., Ayala, S.M., Escobar, G.I., Lucero, N.E.** 2004. Uso de antígenos de *Brucella canis* para detectar anticuerpos anti *B. ovis* en

- ovinos. Acta Bioq. Cl. Latinoam. Suplemento N° 1. IV Congreso de Zoonosis. Libro de resúmenes, pp. 17.
- **Lopez, G., Ayala, S.M., Escobar, G.I., Lucero, N.E.** 2005. Use of brucella canis antigen for detection of ovine serum antibodies against *B. ovis*. Vet. Microbiol. 105: 181-187.
 - **Lopez, G., Escobar, G.I., Ayala, S.M., Lucero, N.E.** 2006a. uso de antígenos de *B. canis* y *B. ovis* para detectar anticuerpos anti-*B. ovis* en leche de ovejas. Acta Bioq. Cl. Latinoam. Suplemento N° 3. V Congreso de Zoonosis. Libro de resúmenes, pp. 199.
 - **Lopez, G., Escobar, G.I., Ayala, S.M., Lucero, N.E.** 2006b. Detection of antibodies to *Brucella ovis* in sheep milk using *B. ovis* and *B. canis* antigen. Vet. Microbiol. 116(1-3):232-238.
 - **López, J., Best, A., Morales, C.** 1998. Diagnostico de Brucelosis bovina en leche por el Ring Test y ELISA en lecherías de la provincia de Ñuble (VIII Región). Arch. Med. Vet. 30 (1):133-138.
 - **Lozano, E.A.** 1986. Etiologic significance of bacterial isolates from rams with palpable epididymitis. Am. J. Vet. Res. 47:1153-1156.
 - **Lucero, N.E.** 1996. *Brucella*. Microbiología biomédica Eds. J.A. Basualdo, C.E. Coto, R.A de Torres, ATLANTE, Buenos Aires.
 - **Lucero, N.E.; Escobar, G.I.; Ayala S.M.; Lopez, G.** 2002. Sensitivity and specificity of an indirect enzyme-linked immunoassay for the diagnosis of *Brucella canis* infection in dogs. J. Med. Microbiol. 51: 656-660.
 - **Lucero, N.E.** 2004. Diagnostico serológico y bacteriológico de brucelosis humana y canina. Temas de Zoonosis II. Asociación Argentina de Zoonosis. Cap 21, pp. 159-164.
 - **Manterola, L., Tejero-Garcés, A., Ficapal, A., Shopayeva, G., Blasco, J.M., Marín, C.M. and López, I.** 2003. Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in semen samples from rams. Vet. Microbiol. 92:65-72.
 - **Marín, C., Jiménez de Bagués, M., Blanco, J., Gamazo, C., Moriyón, I., Díaz, R.,** 1989. Comparison of three serological tests for *Brucella ovis* infection of rams using different antigenic extracts. Vet. Rec.125: 504-508.

- **Marín, C.M., Barberán, M., Jiménez de Bagués, M.P., & Blasco, J.M.** 1990. Comparison of subcutaneous and conjunctival routes of Rev. 1 vaccination for the prophylaxis of *Brucella ovis* infection in rams. Res. Vet. Sci. 48:209-215.
- **Massalski, N.** 1973. Dynamics of IgM and IgG in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. Veterinarnomeditsinski Nauki. 10(10):29-34.
- **McCormick, M., Borra, G. Peña, S., Lynch, G.** 2003. El tambo ovino en Argentina. Boletín ovino de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. Mayo 2003.
- **McFarlane, D. Salisbury, R.M., Osborne, H.V., Jebson, J.L.** 1952. Investigation into sheep abortion in New Zealand during the 1950 lambing season. Aust. Vet. J. 28: 221-226.
- **McGowan, B and Schultz, G.** 1956. Epididymitis of rams: clinical description and field aspects. Cornell Vet. 46:277-281.
- **McGowan, B.** 1979. Epididymitis in rams: effect of vaccination on the clinical incidence of the disease. Cornell Vet. 69:67-72.
- **Meador, V.P., Hagemoser, W.A. and Deyoe, B.L.** 1988. Histopathologic finding in *Brucella abortus*-infected. Am. J. Vet. Res. 49(2):274-280.
- **Medical Progress.** 2005. Brucellosis. N Engl. J Med. 352:2325-2336 www.nejm.org
- **Meinershagen, W.A., Frank, F.W., Waldhalm, D.G.** 1974. *Brucella ovis* as cause of abortion in ewes. Am. J. Vet. Res. 35(5):723-724.
- **Méndez Nárez, G.M., Aparicio, E.D., Morales Alvarez, J.F., Aguilar Romero, F., Suarez Quemmes, Francisco.** 1999. Epididimítis ovina: Estudio bacteriológico y serológico. Vet. Mex. 30(4): 329-336.
- **Metz, C.E.** 1978. Basic principles of ROC analysis. Seminar Nucl. Med. 8(4):283-298.
- **Meyer, M.E.** 1982. *Brucella ovis*, in Handbach der bakteriellen infektionen bei tiernen. Blobel and Scheleba. Jena. Germany.
- **Michaux-Charachon, S., Bourg, G., Jumas-Bilak, E., Guigue-Talet, P., Allardet-Servent, A., O'Callaghan, D., et. al.** 1997. Genome structure and phylogeny in the genus *Brucella*. J. Bacteriol. 179(10):3244-3249.

- **Milicevic, F.** 2005. Departamento de ovinos y lanas. SAGPyA. Republica Argentina. www.sagpya.mecon.gov.ar.
- **Miranda, A., Báez, E.** 2005. Serodiagnóstico en Brucelosis Canina: análisis comparativo entre las técnicas de aglutinación rápida en placa e inmunodifusión en gel de agar. XXVI Sesión de Comunicaciones Científicas. Fac. de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Nordeste, pp. 67.
- **Moreno, E., Stackebrandt, E., Dorsch, M., Wolters, J., Busch, M., Mayer, H.** 1990. *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. J. Bacteriol. 172:3569-3576.
- **Moreno, E. y Moriyón, I.** 2001. The genus *Brucella*. In: Dwordin M., Falkow, S., Resemberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. (Eds). Ed., The Prokaryotes Springer, New York.
- **Moreno, E., Cloeckert, A., Moriyón, I.** 2002. *Brucella* evolution and taxonomy. Vet. Microbiol. 90(1-4):209-227.
- **Moriyón, I.** 1986. Estructura antigénica del género *Brucella*. En: Brucelosis. Ovis. Marzo-abril:39-53.
- **Moriyón, I., y Gamazo.** 1990. Estructura antihigiénica de *Brucella melitensis* y *Brucella ovis*. Ovis. 8:35-49.
- **Moriyón, I., Díaz, R., Lopez-Goñi, I.** 2001. Bacteriología del género *Brucella*. pp.21-30. In: Manual de Brucelosis. Editado por Rodríguez Torres y col. Junta de Castilla y León. Consejería de Sanidad y Bienestar Social.
- **Müller, J.** 1998. Producción de ovinos en el contexto del Mercosur. 2º Simposio nacional de mejoramiento Animal. Uberada, Brasil. pp. 19-27.
- **Muhammed, S., Laueran, L.H., Mesfin, G.M., Otim, C.P.** 1975. Duration of *Brucella ovis* infection in ewes. Cornell Vet. 65:221-227.
- **Muncz, F., Kormendy, B., Mocsy, M.** 1979. Comparison of agar gel precipitation and complement fixation test for the detection of *Brucella ovis* infection. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 26:11-14.
- **Myers, D.M. and Siniuk, A.A.** 1970. Preliminary report on the development of a diffusion-in-gel method for the diagnosis of ram epididymitis. Appl. Microbiol. 19:335-337.

- **Myers, D.M.; Jones, L.M.; Varela Diaz, V.M.** 1972. Studies of antigens for complement fixation and gel diffusion tests in the diagnosis of infections caused by *Brucella ovis* and other brucella. *Appl Microbiol.* 23: 894-902.
- **Myers, D.M.** 1973. Field evaluation of the gel diffusion test for the diagnosis of ram epididymitis caused by *Brucella ovis*. *Appl. Microbiol.* 26:855-857.
- **Myers, D.M., Varela-Diaz, V.** 1979. Serodiagnosis of Ram Epididymitis by Counterimmunoelectrophoresis, using *Brucella ovis* surface R. Antigen. *J. Clin. Microbiol.* 10(4):451-453.
- **Nicoletti, P.** 1989. *Brucellosis in animals.* Ed. Madkour (Butterworths, UK) OIE (2000) Manual of standards for diagnostics tests and vaccines, 4th edition 1-14.
- **Nielsen, K.** 2002. Diagnosis of brucellosis by serology. *Veterinary Microbiology.* 90:447-459.
- **Nielsen, K., Smith, P., Conde, S., Draghi de Benitez, G., Gall, D., Halbert, G., Kenny, K., Massengill, C., Muenks, Q., Rojas, X., Perez, B., Samartino, L., Silva, P., Tollersrud, T and Jolley, M.** 2004a. Rough Lipopolysaccharide of *Brucella abortus* RB51 as a Common Antigen for Serological Detection of *B.ovis*, *B.canis*, and *B. abortus* RB51 Exposure Using Indirect Enzyme Immunoassay and Fluorescence Polarization Assay. *J. Immunoassay & Immunochemistry.* 25 (2): 171-182.
- **Nielsen, K., Smith, P., Gall, D., Perez, B., Cosma, C., Mueller, P., Trotier, J., Cote, G., Boag, L., Bosse, J.,** 1996. Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of antibody to *Brucella abortus* in milk. *Vet. Microbiol.* 52: 165-173.
- **Nielsen, K., Smith, P., Widdison, J., Gall, D., Kelly, L., Nicoletti, P.** 2004c. Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Escherichia coli* 0157:H7. *Vet. Microbiol.* 100:25-30.
- **Nielsen, K., Smith, P., Yu, W., Nicoletti, P., Elzer, P., Robles, C., Bermudez, R., Renteria, T., Moreno, F., Ruiz, A., Massengill, C., Muenks, Q., Jurgensen, G., Tollersrud, T., Samartino, L., Conde, S., Forbes, L., Gall, D., Perez, B., Rojas, X & Minas, A.** 2005. Towards

- single screening tests for brucellosis. Rev. Sci. Tech. Off. Int.Epiz. 24 (3): 1027-1038.
- **Nielsen, K., Smith, P., Yu, W., Nicoletti, P., Elzer, P., Vigliocco, A., Silva, P., Bermudez, R., Renteria, T., Moreno, F., Ruiz, A., Massengill, C., Muenks, Q., Kenny, K., Tollersrud, T., Samartino, L., Conde, S., Draghi de Benitez, G., Gall, D., Perez, B., Rojas, X.** 2004b. Enzyme immunoassay for the diagnosis of brucellosis: chimeric Protein A-Protein G as a common enzyme labeled detection reagent for sera for different animal species. Vet. Microbiol. 101:123-129.
 - **Niilo, L.** 1984. Diagnosis of ovine brucellosis. Can. Vet. J. 25:118-119.
 - **Norcross, N.L.** 1982. Secretion and composition of calostrum and milk J. Am. Vet. Assoc. 181:1057-1060.
 - **Nunez-Torres, E.D., Díaz-Aparicio, E., Hernández-Andrade, L., Trigo-Tavera, F.J., Suarez-Guemes, F.** 1997. Sensitivity and specificity of an ELISA as a screening test for the diagnosis of *Brucella ovis* in sheep. Rev. Latinoam. Microbiol. 39(3-4):123-128.
 - **OIE.** 2000. Ovine epididymitis (*Brucella ovis*). Manual of Standards Diagnostic Tests and Vaccines. Office International des Epizooties. 4th ed. Paris, pp. 1-14 (Chapter 2.4.1.)
 - **OIE.** 2004a. Ovine epididymitis (*Brucella ovis*). Manual of Standards Diagnostic Tests and Vaccines. Office International des Epizooties. 5th ed. Paris, pp. 1-14 (Chapter 2.4.1.)
 - **OIE.** 2004b. Caprine and ovine brucellosis (excluding *Brucella ovis*). Manual of Standard Diagnostic Tests and Vaccines. Office International des Epizooties. 5th ed. Paris, pp.1-14 (Chapter 2.4.2).
 - **Orduña A., Bratos Perez, M.A., Abad Fernández, R., Ruiz García L., De Frutos Serna, M., Rodríguez Torres, A.** 2001a. La Brucelosis, etiología y origen de la infección humana, pp. 13-20. En: Manual de Brucelosis. Editado por Rodríguez Torres y col. Junta de Castilla y León. Consejería de Sanidad y Bienestar Social.
 - **Orduña A., Lopez, L., Miguel, M.A., Gutiérrez, P., Fernández, J.M., Torres, A.R.** 2001b. Patogenia de la Brucelosis humana, pp. 99-111. En:

Manual de Brucelosis. Editado por Rodríguez Torres y col. Junta de Castilla y León. Consejería de Sanidad y Bienestar Social.

- **Orduña, A., Abad, R., Zarzosa, M.P., Dueñas, A., Mantecon, M. A., Eiros, J. M., Torres, A.R.** 2001c. Diagnostico Microbiológico de la Brucelosis, pp.121-139. En: Manual de Brucelosis. Editado por Rodríguez Torres y col. Junta de Castilla y León. Consejería de Sanidad y Bienestar Social.
- **Osterman, B., Moriyon, I.** 2006. International Committee on Systematics of procaryotes, subcommittee on taxonomy of *Brucella*. Minutes of the meeting, 17 September 2003, Pamplona, Spain. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56:1173-1175.
- **Otrowski, J., Cedro, V., Giannico, C., Laporte, O., Cisale, H., de Benedetti, L.** 1963. Epididimitis. Su repercusión posible en el índice de procreos, en algunos establecimientos rurales del centro de la provincia de Buenos Aires. An.Soc. Rural Arg. 97:24-27; 55-57.
- **Paolicchi, F.A., Campero, C.M., Casaro, A.P., Kortebani, G., Mazzolli, A.** 1990. Respuesta antitesticular y/o antiespermática en un modelo experimental de epididimitis en carneros a *Brucella ovis*. XXXV Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Mar del Plata, Argentina.
- **Paolicchi, F.A., Campero, C.M., Zamora, A.S., Cipolla, A.L., Casaro, A.P.** 1991. Lesiones anatomopatológicas en genitales de carneros enviados a faena. Rev. Med. Vet. 72(4):176-185.
- **Paolicchi, F., Casaro, P. A., Gimeno, E.J., Kortebani, L.G., Mazzolli, A.B.** 2000a. Antisperm response in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. Small Ruminant Res. 36:7-15.
- **Paolicchi, F., Silva, P., Malena, R., Solanet, C., Ramondino, R., Eberhard, A., Vigliocco, A.** 2000b. Aislamiento de *Brucella ovis* del tracto genital y leche de ovejas con persistencia de títulos positivos a ELISA. XXI World Buiatrics Congreso, Punta del Este.
- **Paolicchi, F.** 2001. Epididimitis ovina por *Brucella ovis*: Lesiones genitales y respuesta inmune antiespermática. Rev. Med. Vet. 82(2):86-88.

- **Paolicchi, F.** 2005. Estudios efectuados sobre Brucellosis ovina. Curso de actualización en Manejo Sanitario Ovino. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria Balcarce.
- **Pennimpepe, E.F.F.** 1998. Brucelosis: situación actual e implicancias productivo-sanitarias. Temas de Zoonosis y Enfermedades Emergentes. 2º Congreso Argentino de Zoonosis, pp. 58-63.
- **Peter, A.T.** 2002. Ovine and caprine reproduction. In: Comparative Theriogenology course (VCS 540). Purdue University, USA.
- **Pizarro-Cerda, J., Meresse, S., Parton, R.G., Van der Goot, G., Solalanda, A., Lopez-Goni, I., et al.** 1998. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of non professional phagocytes. Infect. Immun. 66(12):5711-5724.
- **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*. Aust. Vet. J. 63(12):409-412.
- **Radostits, O., Blood, D.C., Gay, C.C.** 1994. Diseases caused by *Brucella spp.* Veterinary Medicine 8th ed. Bailliere Tynhall, WB Saunders & Co. London.
- **Rahaley, R.S.** 1982. *Brucella ovis*, infection in sheep. The Compendium on Continuing Education. 4:461-467.
- **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. Vet. Rec. 113:467-470.
- **Ramis, C.R.** 2000. Reseña sobre el uso de cepas vacunales lisas y rugosas de *Brucella abortus* y sus posibles riesgos. Boletín veterinario. Suplemento técnico del Colegio Veterinario de la pcia. de Buenos Aires, Argentina. 15:57-61.
- **Ridler, A., West, D., Stafford, K., Wilson, P., Collet, M.** 2002. Effects of vaginal *Brucella ovis* infection of red deer hinds on reproductive performance, and venereal transmission to stags. N Z Vet. J. 50(4):126-131.
- **Riezu Boj, J.I., Moriyón, I., Blasco, J.M., Marín, C., Díaz, R.** 1986. Comparison of lipopolysaccharide extracts in an enzyme-linked

- immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella ovis* infection. J. Clin. Microbiol. 23:938-942.
- **Riezu-Boj, J.I., Moriyón, I., Blasco, J.M., Gamazo, C., Díaz, R.** 1989. Analysis by immuno-blot of the antibody response of sheep infected by smooth and rough brucellae to outer membrane proteins extracted with hot saline. Infect. Immun. 58(1).
 - **Riezu Boj, J.I., Moriyón, I., Blasco, J.M., Gamazo, C., Diaz, R.** 1990. Antibody response to *Brucella ovis* outer membrane proteins in ovine brucellosis. Infect. Immun. 58:489-494.
 - **Riezu-Boj, J., Moriyón; I., Gamazo, C., Díaz, R., Winter, A.** 1990. Analysis by inmunoblot of the antibody response of sheep infected by smooth and rouge *Brucellae* to outer membrane proteins extracted with hot saline. Infect. Immun. 53:489-494.
 - **Ris, D.R.** 1970. The bacteriology and serology of ewes inoculated with *B. ovis* organisms. New Zealand Veterinary Journal.18:2-7
 - **Ris, D., Hamel, K., Long, D.,** 1984. Comparison of an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) with the cold complement fixation test for the serodiagnosis of *Brucella ovis* infection. N. Z. Vet. J. 32: 18-20.
 - **Ris, D.R. and Te Punga, W.A.** 1984. An indirect haemagglutination test for the detection of *Brucella ovis* antibodies. Development of the test. N.Z. Vet. J. 11:94-97.
 - **Rivera A., D.Y., Rueda, O.E., Calderón C.P., Mariño J., O.C., Gall, D., y Nielsen, K.** 2003. Evaluación comparativa del método inmunoenzimático indirecto en leche para la detección de bovinos infectados con *Brucella abortus*, en hatos del departamento de Cundinamarca, Colombia. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 22(3): 1065-1075.
 - **Robles, C.A.** 1992. Orquioepididimítis infecciosa del borrego y del carnero. 3º Congreso mundial de ovinos y lanas. Comunicación técnica, INTA Bariloche, pp. 323-333
 - **Robles, C.A.; La Torraca, A.; Sancholuz, M.; Uzal, F.A.: Evans, E.** 1993. Brucelosis ovina en majadas Merino de la provincia. de Chubut. Argentina. Vet. Argentina. 10: 458-461.

- **Robles, C.A.** 1994. Contagious epididymitis in rams due to *Brucella ovis*: An epidemiological study in a flock in Patagonia region, Argentina. University of Edinburgh, Scotland (UK) . Sc. Thesis.
- **Robles, C.A.** 1998. Epididimitis contagiosa de los carneros por *Brucella ovis*. Rev. Med. Vet. 79 (1): 67-71.
- **Robles, C.** 2003. Antecedentes de la brucelosis bovina en Patagonia. INTA. Comunicación técnica. www.inta.gov.ar
- **Ross, H., Jahans, K., MacMillan, A., Reid, R., Thompson, P., Foster, G.** 1996. *Brucella* specie infection in North Sea seal and cetacean populations. Vet. Rec. 138:647-648.
- **Ruelas, D., Rosadio, R.A.** 1999. Desarrollo y estandarización de una prueba de ELISA indirecta para Brucelosis ovina. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 10 (2):43-55.
- **SAGPyA (Secretaría de Agricultura Ganadería Pesca y Alimentación).** 2006. Boletín ovino. www.sagya.mecon.gov.ar
- **Sales Henriques, H.L.R., Hueston, W.D., Hoblet, K.H., Shulaw, W.P.** 1992. Field trial evaluating the safety and serologic reactions of reduced-dose *Brucella melitensis* Rev. 1 vaccination in adult sheep. Prev. Vet. Med. 13:205-215.
- **Salhi, I., Boigegrain, R.A., Machold, J., Weise, C., Cloeckert, A., Rouot, B.** 2003. Characterization of new members of the group 3 outer membrane protein family of *Brucella* spp. Infect. Immun. 71(8):4326-4332.
- **Samartino, L.** 2002. Brucellosis in Argentina. Vet. Microbiol. 90: 71-80.
- **Samartino, L.** 2006. Brucelosis en animales de producción, transmisión al hombre y su prevención. Temas de Zoonosis III. Asociación Argentina de Zoonosis. Cap.14, pp. 141-147
- **Sanchis, R., et Abadie, G.** 1986. Application d'une technique immunoenzymatique (ELISA) au sérodiagnostic de l'épididymite contagieuse du bélier (Infection a *Brucella ovis*). Réc. Méd. Vét. 162 :477-484.
- **Santos, J.M., Verstreate, D.R., Perera, V.Y. & Winter, A.J.** 1984. Outer membrane proteins from rouge strains of tour *Brucella* species. Infect. Immun. 46:188-194.

- **Saravi, M.A., Draghi de Benitez, G., Gregoret, R.J., Samartino, L.E.** 1993. El test de ELISA en el diagnostico serológico de la brucelosis ovina. Estudio preliminar. RIA, 24 (1):15-19.
- **Schoonjans, F., Zalata, A., Depuydt, C.E., Comhaire, F.H.,** 1995. Medical: a new computer program for medical statistics. Comp. Meth. Progr. Biomed. 48:257-262.
- **Seco-Mediavilla, P., Verger, J.M., Grayon, M., Cloeckert, A., Marín, C.M., Zygmunt, M.S., et al.** 2003. Epitope mapping of the *Brucella melitensis* BP26 immunogenic protein: usefulness for diagnosis of sheep brucellosis. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 10(4):647-651.
- **Shergin, Y.K., Vozhdaev, N.S., Kim, V.I.** 1974. Infectious epididymitis of rams. Veterinariya. 1:58-59.
- **Shin, S.J., Carmichael, L.** 1999. Brucelosis canina causada por *Brucella canis*. International Veterinary Information Service. www.ivis.org.
- **Shortridge, E.H.** 1962. Lesions of the testicle and epididymis of rams. N.Z. Vet. J. 10:23-26.
- **Sikkema, W.D.** 1989. An Fc-binding protein. Am. Biotech. Lab. 7:22-23.
- **Simmons, G.C. and Hall, W.T.** 1953 Epididymitis in rams. Aust. Vet. J. 29:33-40.
- **Smith, B.P., Oliver, D.G., Singh, P., Dilling, G., Marvin, P.A., Ram, B.P., Jangn, L.S., Sharkov, N., Orsborn, J.S. et al.,** 1989. Detection of Salmonella Dublin mammary gland infection in carrier cows, using an enzyme-linked immunosorbent assay for antibody in milk and serum. Am.J.Vet.Res. 50: 1352-1360.
- **Späth, E.J.A.; Paolicchi, F.; Malena, R.** 2002. Epididimitis ovina: análisis serológicos realizados entre 1998 y 2002. Portal Veterinario 1-5. www.portalveterinaria.com
- **Spencer, t., Burgess, G.,** 1984. Enzyme linked immunosorbent assay for *Brucella ovis* specific antibody in ram sera. Res. Vet. Sci. 36:194-198.
- **Suarez, C.E., Pacheco, G.A., Vigliocco, A.M.** 1990. Immunochemical studies of oligosaccharides obtained from the lipopolysaccharide of *Brucella ovis*. Vet. Microbiol. 22:329-334.

- **Sutra, L., Caffin, J.P. & Dubray, G.** 1986. Role of milk immunoglobulin in the *Brucella* milk ring test. *Vet. Microbiol.* 12:359-366.
- **Szyfres, B.; Chappel, R.** 1962. Comprobación bacteriológica de la epididimitis infecciosa ovina en la República Argentina. *Revista Facultad de Cs. Veterinarias de La Plata.* 3: 405-409.
- **Teixeira-Gomes, A.P., Cloeckaert, A., Bezard, G., Bowden, R.A., Dubray, G., Zygmunt, M.S.** 1997. Identification and characterization of *Brucella ovis* immunogenic protein two-dimensional electrophoresis and immunoblotting. *Electrophoresis.* 18(8):1491-1497.
- **Teixeira-Gomes, A., Cloeckaert, A., Zygmunt, M.S.** 2000. Characterization of heat, oxidative, and acid stress responses in *Brucella melitensis*. *Infect. Immun.* 68(5):2954-2961.
- **Terzolo, H.R., Paolicchi, F., Moreira, A.R., Homse, A.** 1991. Skirrow agar for simultaneous isolation of *Brucella* and *Campylobacter* species. *Vet. Rec.* 129:531-532.
- **Tibor, A., Saman, E., De Wergifosse, P., Cloeckaert, A., Limet, J.N., Letesson, J.J.** 1996. Molecular characterization, occurrence, and immunogenicity in infected sheep and cattle of two minor proteins of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* 64:100-107.
- **Van Rensburg, S.W., Van Heerden, K.M., Le Roux, D.J and Snyders, A.j.** 1958. Infectious infertility in sheep. *J.S. Afr. Vet. Med. Assoc.* 29:223-233.
- **Van Tonder, E.M.** 1977. Examination of rams for genital soundness. *J. S. Afr. Vet. Med. Assoc.* 48:267-272.
- **Velasco, J., Díaz, R., Grillo, M.J., Barberán, M., Marín, C., Blasco, J.M., Moriyón, I.** 1997. Antibody and delayed type hypersensitivity responses to *Ochrobactrum anthropi* cytosolic and outer membrane antigens in infections by smooth and rough *Brucella* spp. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 4:279-284.
- **Verger, J.M., Grimont, M.F., Grimont, P.A and Grayon, M.** 1985. *Brucella*, a monoespecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35:292-295.
- **Verger, J.M.** 1986. Estudio y diagnóstico bacteriológicos en Brucelosis. *Bovis.* Marzo-abril, pp.27-37.

- **Vigliocco, A.M.; Silva Paulo, P.S.; Mestre J., Briones, G.C., Draghi, G., Tossi, M., Nielsen, K.** 1997. Development and validation of indirect enzyme immunoassay for detection of ovine antibody to *Brucella ovis*. *Vet. Microbiol.* 54: 357-368.
- **Wallach, J.C.** 1998. Epidemiología y clínica de la brucelosis humana transmitida por alimentos. *Temas de Zoonosis y Enfermedades Emergentes.* 2º Congreso Argentino de Zoonosis, pp. 64-67.
- **Walt, D.A.** 1972. Testicular abnormalities and spermatogenesis of the ovine and other species. *Vet. Bull.* 42:181-189.
- **Wanke, M.M.** 2006. Brucelosis canina. *Temas de Zoonosis III.* Cap. 15, pp. 148-157.
- **Watson, W.A.** 1979. Disease and reproduction in sheep. The management and diseases of sheep. Edited by The British Council. London SW1 A 2BN.
- **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. *Aust. Vet. J.* 56:172-175.
- **Wernicke, E.** 1933. El paso del ganado lanar del Antiguo al Nuevo Mundo. *Anales de la Sociedad Rural Argentina.* Buenos Aires, Argentina. Julio, pp. 345-352.
- **Whittington, R.J., Saunders, V.F., Egerton, J.R.** 1996. Antigenic cross-reactions between the causative agent of ovine footrot, *Dichelobacter nodosus*, and other bacteria. *Small Ruminant Res.* 22:55-67.
- **WHO (World Health Organization).** 2004. Laboratory biosafety manual. Third edition, Geneva.
- **Worthington, R.W., Weddell, W., Penrose, M.E.,** 1984. A comparison of three serological tests for diagnosis of *B. Ovis* infection in rams. *N. Z. Vet. J.* 32: 58-60.
- **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 *N. Z. Vet. J.* 32: 58-60.
- **Wright, P.F., Nilsson, E.M., Van Rooij, E. Latenta, M. Jeggo, M.H.** 1993. Standardization and validation of enzyme linked immunosorbent assay

techniques for detection of antibodies in infectious diseases. Rev. Sci. Tech OIE. 12(2):435-450.

- **Zamora, J., Chahuan, E., Polette, M., Alonso, O., Rojas, X., Kruze, J. and Herve, M.** 1977. *Brucella ovis* and other etiological agents in infectious epididymitis and orchitis in rams. Arch. Med. Vet., Chile. 9:94-99.
- **Zygmunt, M.S., Baucheron, S., Vizcaino, N., Bowden, R.A., Cloeckert, A.** 2002. Single-step purification and evaluation of recombinant BP26 protein for serological diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. Vet. Microbiol. 87(3):213-220.

SECTION TITLE

Sensitivity and specificity of an indirect enzyme-linked immunoassay for the diagnosis of *Brucella canis* infection in dogs

N. E. LUCERO, G. I. ESCOBAR, S. M. AYALA and G. LOPEZ*

*Brucellosis Laboratory, ANLIS Dr C. G. Malbrán, Avda Velez Sarsfield 563, 1281 Buenos Aires and *Zoonosis Center, Municipalidad Lomas de Zamora, 12 de octubre 1060, Banfield, Argentina*

The diagnosis of *B. canis* infection in dogs is based on bacteriological examination and serological methods including agglutination and gel diffusion tests. Bacteriological studies are the only methods that have been considered specific but, as intermittent periods of bacteraemia may occur, a negative blood culture cannot be used as a criterion for excluding canine brucellosis. Close contact between people and infected dogs increases the risk of transmission; however, its impact on public health is probably underestimated due to lack of reporting and inadequate diagnostic services. This paper describes an indirect enzyme-linked immunoassay (IELISA) procedure for the diagnosis of brucellosis caused by *B. canis* in a population of normal and infected dogs previously screened by the buffered plate antigen test (BPAT) and rapid slide agglutination test (RSAT). The serological survey was performed with 446 field sera. The 270 sera from the asymptomatic group found negative by BPA, RSAT and blood culture showed IELISA specificities of 96.7% and 100%, respectively, when cut-off values of OD 0.237 and 0.281 were selected. For 52 sera from culture-positive dogs, IELISA sensitivity was 100% with cut-off values of OD₄₁₄ 0.237 and 0.281. OD₄₁₄ 0.281 was selected because this value provided the highest accuracy with minimal false-negative and false-positive results. This cut-off value was used to study 124 blood culture-negative but RSAT positive sera. IELISA produced 107 positive results; the 17 sera that were negative by IELISA presented a wide range of reactivities by RSAT (2 were RSAT positive at 1 in 2 dilution and 15 were weakly positive with pure serum). These samples were probably from animals at an early stage of the infection or were false-positive results. The IELISA described here detects IgG and IgA antibodies that are useful for evaluating the clinical status of dogs. Although RSAT is a practical screening test, a supplementary technique such as IELISA should be used on all positive RSAT samples to ensure diagnostic specificity. Furthermore, people in contact with infected dogs could be investigated for possible transmission. The procedure described in this study was relatively simple and could have widespread applications.

Introduction

Transmission of *Brucella canis* commonly occurs by contact with products of abortion or subsequent vaginal discharges. Infected males harbour organisms in the prostate gland and epididymides for many months after the bacteraemia has ceased and may disseminate the disease in semen when they breed [1]. Clinical signs are not adequate to diagnose canine brucellosis, as

many infected males are clinically normal. However, the infection may be suspected when there is a history of abortions, diskospondylitis or poor reproductive performance in either sex.

Serological tests are the methods most commonly used to evaluate the status of dogs before breeding or whenever brucellosis is suspected. Blood cultures are essential for diagnosis, especially if serological results are ambiguous. The serological tests usually used are the rapid slide agglutination test (RSAT) and the tube agglutination test (TAT) (both with 2-mercaptoethanol). These tests are sensitive but many false-positive results

Received 31 Jan. 2002; accepted 8 March 2002.
Corresponding author: Dr N. E. Lucero (e-mail: nidia@elsitio.net).

have been found. Agar gel immunodiffusion (AGID) has been used but sometimes the precipitin lines are difficult to interpret. More recently, indirect enzyme-linked immunoassay (IELISA) with cytoplasmic protein antigen, hot saline extracts or cell-wall antigens have been proposed [2–5].

Because of the threat of transmitting the disease to man, dogs suspected of having brucellosis should be investigated promptly. This paper describes an IELISA procedure for the diagnosis of brucellosis caused by *B. canis* in a population of normal and infected dogs previously screened by buffered plate antigen test (BPAT) and RSAT. The IELISA cut-off value was determined and the performance of the tests in terms of diagnostic specificity and sensitivity was analysed.

Materials and methods

Serological tests

The RSAT screening tests were performed as described previously [3], but with serial serum dilutions to find the final titre. Briefly, 10 μ l of serum dilution were mixed with 10 μ l of antigen on a 25 \times 75-mm glass slide for 1–2 min and results were read with a 10 \times microscope objective, including a control standard serum whose titre was known. The antigen was prepared at ANLIS Dr C. G. Malbrán from the strain (M–) variant of *B. canis* kindly provided by Professor L. Carmichael who also supplied the antigen used as reference (L. Carmichael, personal communication). The buffered plate agglutination test (BPAT), Rose Bengal test (RB) and plate agglutination test (PAT) were done as described previously [6] with an antigen prepared at ANLIS Dr C. G. Malbrán from *B. abortus* strain 1119-3.

IELISA

Antigen. The antigen was obtained from the (M–) variant of *B. canis* by the procedure described previously for *B. ovis* [7, 8]. Briefly, *B. canis* saline extract was prepared as described by Myers *et al.* [9], then centrifuged at 254 000 *g* in a Kontron Instrument Ultra Centrifuge in a TFT 45.94 rotor for 4 h at 4°C. The pellet was dissolved in PBS, pH 7.2, frozen at –20°C and used at 1 in 2000 dilution after OD₄₁₄ readings of various antigen dilutions with strongly positive, weakly positive and negative sera as controls. The control sera were from dogs with positive isolation of *B. canis* and positive RSAT with a titre of 1 in 128 and 1 in 8, respectively. The negative serum was from a healthy dog negative in RSAT and BPAT.

Conjugate. A lyophilised horseradish peroxidase-conjugated protein A/G was obtained from Immuno-Pure (Pierce Lb) and used at 1 in 20 000 after titration with strongly positive, weakly positive and negative dog sera.

Procedure. The antigen diluted in 0.06 M sodium carbonate buffer (pH 9.6) was passively coated on to polystyrene plates (Nunc 2-69620, Denmark) at 50 μ l/well and incubated for 18 h at room temperature and then washed five times in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS) containing Tween 20 0.05%, pH 7.2 (PBS/T). Control and test sera were added at 1 in 100 in PBS/T, 50 μ l/well, for 1 h at room temperature. After five washes in PBS/T, appropriately diluted horseradish peroxidase-conjugated protein A/G, was added, 50 μ l/well, and incubated for 1 h at room temperature. After five washes in PBS/T, the final step was the addition of 100 μ l of chromogenic substrate (4.0 mM H₂O₂ and 1.0 mM 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt in 0.05 M citrate buffer, pH 4.5) per well. The plate was shaken continuously on an orbital shaker and, after 10 min, the OD was measured at 414 nm in a photometer (Labsystems Multiskan EX microplate reader) with 100 μ l of chromogenic substrate in a plate as a control for the microplate reader. When the test is positive, colour develops.

Bacteriological studies

Brucella organisms were isolated as described previously [1] from a blood culture, semen or vaginal discharge. The isolates were typed as recommended by the International Committee on Bacterial Nomenclature (ICBN) Subcommittee on Taxonomy of the Genus *Brucella* [10] at ANLIS Dr C. G. Malbrán.

Canine sera

The 446 sera included in the study were divided into the following groups. (i) *Brucella*-infected dogs: 52 sera were from dogs with confirmed brucellosis by clinical examination, serology and positive cultures. (ii) Asymptomatic dogs: 270 sera were from healthy dogs with no clinical or epidemiological evidence of brucellosis plus negative blood culture and negative serological tests such as RSAT and BPAT. (iii) Dogs with suspected brucellosis: 124 sera from dogs with clinical symptoms compatible with brucellosis, showing positive results to RSAT at any titre but negative blood culture.

Data analysis

Diagnostic specificity and sensitivity were determined initially with 95% confidence limits by plotting the data for negative and positive samples on a frequency histogram. The data were subsequently analysed by receiver-operator characteristics (ROC) analysis [11].

Results

The 270 sera negative in IELISA had a mean OD₄₁₄ value of 0.148 (SD 0.043). Fig. 1 shows the frequency

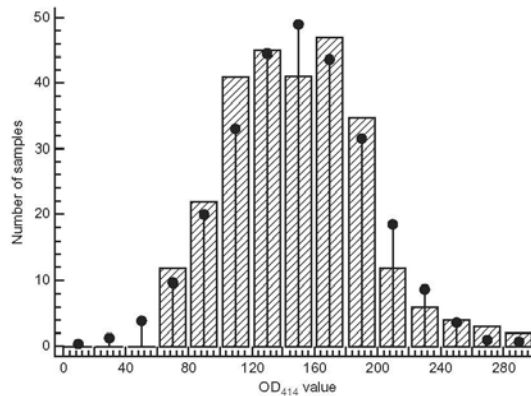


Fig. 1. Frequency distribution of IELISA results with 270 serum samples negative for antibody to *B. canis*.

distribution of these sera. Therefore, a cut-off value of OD₄₁₄ 0.236 (2 SD) or OD 0.279 (3 SD) was established and then confirmed with 52 positive sera from *Brucella*-infected dogs and 270 negative sera from asymptomatic dogs by ROC curve (Fig. 2). The OD₄₁₄ 0.281 cut-off value resulted in IELISA sensitivity and specificity of 100%.

Table 1 shows the serological test results for the sera of 52 dogs with positive isolation of *B. canis*; most of the isolates were from blood culture except dog 46, which was positive by swab of vaginal discharges. Of the 124 sera from dogs suspected of having brucellosis, six

with weak or positive BPA titres were studied by PAT and RBT. Only one was weakly positive in RB and PAT at a dilution of 1 in 50. All six sera were positive in both IELISA and RSAT. Of 118 sera negative by BPA, 101 were positive by IELISA, showing low, moderate or high titres by RSAT. Of the 17 sera negative in IELISA, 2 were positive by RSAT at a dilution of 1 in 2 and 15 were weakly positive as pure serum.

Discussion

Canine brucellosis is an insidious disease that may be suspected when abortions occur in the last trimester or when epididymitis and testicular atrophy are observed in male dogs. They may be infertile and may show orchidism with varying degrees of prostatitis. However, many infected dogs are clinically normal. Close contact between man and infected dogs increases the risk of transmission; however, the impact on public health is probably underestimated because of lack of reporting and inadequate diagnostic services. The diagnosis of *B. canis* infection in dogs is based on bacteriological examination and serological methods, usually agglutination and gel diffusion tests. Bacteriological studies are the only method that has been considered specific but, as intermittent periods of abacteraemia may occur, a negative blood culture cannot be used as a criterion for excluding canine brucellosis. Agglutination tests have good sensitivity but their lack of specificity and the occurrence of false positive serological results make a specific test necessary.

The objectives of this study were to ascertain the usefulness of IELISA for the diagnosis of brucellosis caused by *B. canis* and to determine the cut-off value. The serological survey was performed with 446 field

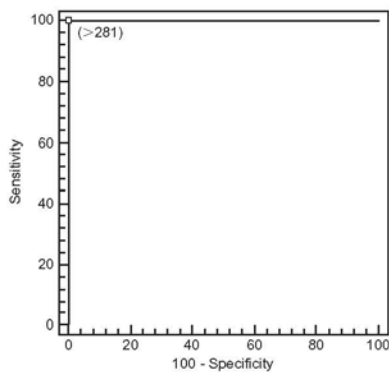


Fig. 2. ROC analysis plotting percent sensitivity (y axis) against 100-specificity (x axis) for various cut-off values. From the data a cut-off value of OD₄₁₄ 0.281 provides specificity and sensitivity values of 100%.

Table 1. Serological response of sera from *B. canis* culture-positive dogs* to IELISA and RSAT

Serum no.	RSAT [†]	IELISA (OD ₄₁₄)	Isolated from
1	128	0.930	Blood
2	8	0.749	Blood
3	8	0.762	Blood
4	16	0.687	Semen and blood
5	4	0.531	Blood
6	64	0.977	Blood
7	32	0.691	Blood
8	8	0.938	Blood
9	32	0.673	Blood
10	64	0.751	Blood
11	32	0.902	Blood
12	8	0.961	Blood
13	8	0.982	Semen and blood
14	4	0.898	Blood
15	2	0.503	Blood
16	4	0.870	Blood
17	8	0.548	Blood
18	2	0.567	Blood
19	2	0.562	Blood
20	8	0.582	Blood
21	32	1.070	Blood
22	4	0.494	Blood
23	2	0.405	Blood
24	32	0.838	Blood
25	16	0.653	Blood
26	4	0.706	Blood
27	4	0.729	Blood
28	8	0.746	Blood
29	2	0.502	Blood
30	4	0.615	Blood
31	64	0.793	Blood
32	4	0.356	Blood
33	32	1.180	Blood
34	4	0.950	Blood
35	2	0.668	Blood
36	32	0.744	Blood
37	32	0.654	Blood
38	16	0.456	Blood
39	8	0.582	Blood
40	32	0.430	Blood
41	256	0.579	Blood
42	32	0.506	Blood
43	64	0.491	Blood
44	32	0.412	Blood
45	256	0.498	Blood
46	128	0.626	Vaginal swab
47	8	0.432	Vaginal swab and blood
48	32	0.574	Vaginal swab and blood
49	16	0.590	Blood
50	64	0.640	Blood
51	32	0.946	Blood
52	16	0.489	Blood

*All sera were negative for BPAT.

[†]Serum dilutions.

sera. The 270 sera from the asymptomatic group found negative by BPA, RSAT and blood culture showed IELISA specifications of 96.7% and 100%, respectively, when cut-off values of OD₄₁₄ 0.237 and 0.281 were selected. For 52 sera from culture-positive dogs, the IELISA sensitivity was 100% with cut-off values of OD₄₁₄ 0.237 and 0.281.

The cut-off value of OD₄₁₄ 0.281 was selected because this value has the highest accuracy plus minimal false-

negative and false-positive results. With this cut-off value, 124 blood-culture negative but RSAT-positive sera were studied and IELISA produced 107 positive results. The 17 sera that were negative by IELISA presented a wide range of reactivities by RSAT (2 were RSAT positive at a dilution of 1 in 2 and 15 were weakly positive with pure serum); these samples were probably from animals at an early stage of the infection or were false-positive results. Of six sera that were positive by both BPA and RSAT, only one was weakly positive in RB, but all six sera were strongly positive in RSAT and IELISA. Some overlapping in the detection of antibodies against rough and smooth *Brucella* strains has been reported [4], but in the present study this phenomenon was observed in only 6 (1.34%) of 446 cases.

The IELISA described here detects IgG and IgA antibodies that are useful for evaluating the clinical status of dogs. Although the RSAT is a practical screening test, a supplementary technique such as IELISA should be performed on all positive RSAT samples to ensure diagnostic specificity. Furthermore, it is suggested that studies of people in contact with infected dogs should be performed to investigate possible transmission.

The data presented clearly indicate that IELISA was more sensitive and specific than RSAT. The procedure described in this study was relatively simple to perform and may have widespread applications.

We are very grateful to Dr Klaus Nielsen from the Canadian Food Inspection Agency, Animal Research Institute, Ontario, Canada, for critically reading the manuscript.

References

1. Carmichael LE, Shin SJ. Canine brucellosis: a diagnostician's dilemma. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 1996; **11**: 161–165.
2. Baldi PC, Wanke MM, Loza ME, Monachesi N, Fossati CA. Diagnosis of canine brucellosis by detection of serum antibodies against an 18 kDa cytoplasmic protein of *Brucella* spp. *Vet Microbiol* 1997; **51**: 273–281.
3. Carmichael LE, Joubert JC. A rapid slide agglutination test for the serodiagnosis of *Brucella canis* infection that employs a variant (M–) organism as antigen. *Cornell Vet* 1987; **77**: 3–12.
4. Mateau-de-Antonio EM, Martin M, Soler M. Use of indirect enzyme-linked immunosorbent assay with hot saline solution extracts of a variant (M–) strain of *Brucella canis* for diagnosis of brucellosis in dogs. *Am J Vet Res* 1993; **54**: 1043–1046.
5. Serikawa T, Iwaki S, Mori M, Muraguchi T, Yamada J. Purification of a *Brucella canis* cell wall antigen by using immunosorbent columns and use of the antigen in enzyme-linked immunosorbent assay for specific diagnosis of canine brucellosis. *J Clin Microbiol* 1989; **27**: 837–842.
6. Lucero NE, Bolpe JE. Buffered plate antigen test as a screening test for diagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol* 1998; **36**: 1425–1427.
7. Suarez CE, Pacheco GA, Vigliocco AM. Characterization of *Brucella ovis* surface antigens. *Vet Microbiol* 1988; **18**: 349–356.
8. Vigliocco AM, Silva Paulo PS, Mestre J et al. Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of ovine antibody to *Brucella ovis*. *Vet Microbiol*

- 1997; **54**: 357–368.
9. Myers DM, Jones LM, Varela Diaz VM. Studies of antigens for complement fixation and gel diffusion tests in the diagnosis of infections caused by *Brucella ovis* and other *Brucella*. *Appl Microbiol* 1972; **23**: 894–902.
10. Corbel MJ, Brinley-Morgan WI. Genus *Brucella*, Meyer and Shaw 1920, 173 AL. In: Krieg NR, Holt JG (eds), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 1. Baltimore, MD, Williams & Wilkins 1984: 377–388.
11. Schoonjans F, Zalata A, Depuydt CE, Comhaire FH. MedCalc: a new computer program for medical statistics. *Comput Methods Programs Biomed* 1995; **48**: 257–262.



Use of *Brucella canis* antigen for detection of ovine serum antibodies against *Brucella ovis*

G. López^a, S.M. Ayala^b, G.I. Escobar^b, N.E. Lucero^{b,*}

^aFacultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Lomas de Zamora, Ruta 4 Km 2.5, Llavallol, Buenos Aires, Argentina

^bANLIS Dr. C.G. Malbrán, Avda. Velez Sarsfield 563, 1281 Buenos Aires, Argentina

Received 31 May 2004; received in revised form 23 September 2004; accepted 19 October 2004

Abstract

Brucella ovis causes a genital disease of sheep manifested by epididymitis in rams and placentitis in ewes producing reduced fertility in the flock. Clinical diagnosis is not sensitive enough and bacteriological testing is not feasible for detection of the disease in large numbers of animals. Indirect methods of serological testing are preferred for routine diagnosis, of which agar gel immunodiffusion (AGID), complement fixation (CF) and ELISA tests are recommended as the most efficient. Since *B. ovis* shares antigenic components with *Brucella canis*, it would seem that either strain could be used as antigen with the same results; however, the advantage of the *B. canis* (M–) strain variant is that it can be used to develop a satisfactory antigen for agglutination tests. We present data on AGID and IELISA tests using *B. ovis* antigen and rapid screening agglutination test (RSAT), 2-mercapto-ethanol RSAT (2ME-RSAT) and IELISA using *B. canis* antigen. We tested 225 animals. The cut-off values were adjusted by ROC analysis using 51 negative and 32 positive sera; the IELISA-*B. canis* cut-off value was 39 (%P) and IELISA-*B. ovis*, 51 (%P), with 100% sensitivity and specificity. Of the 32 positive sera from the infected flock RSAT detected 32 (100%), 2ME-RSAT 29 (91%) and AGID 31 (97%). Of the 142 sera from suspicious flocks, 46 were negative and 56 positive in all the tests; 16 were positive by RSAT, IELISA-*B. canis* and IELISA-*B. ovis*, 20 positive only with RSAT and 2 positive only by both IELISAs. RSAT is a very sensitive screening test that, because of its simplicity and easy interpretation, following a study in larger sample, could replace AGID as a screening test for diagnosis of ovine brucellosis caused by *B. ovis*. The IELISA-*B. canis* or IELISA-*B. ovis* could be used as confirmatory tests, since they show equal specificity and sensitivity.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *B. ovis* brucellosis; Ovine brucellosis

1. Introduction

Brucella ovis causes a genital disease of sheep manifested by epididymitis in rams and placentitis in ewes producing reduced fertility in the flock. The disease has been reported in Latin American and European countries, the United States of America,

* Corresponding author. Tel.: +54 11 4303 2382; fax: +54 11 4303 2382.

E-mail address: nidia@elsitio.net (N.E. Lucero).

Canada, Australia and New Zealand, but probably occurs in most sheep-raising countries (OIE, 2000).

Clinical diagnosis is not sensitive enough and is very unspecific because many other bacteria cause the same symptoms and bacteriological isolation is required to confirm the disease.

In infected rams, *B. ovis* can be detected in semen or the reproductive tract and its associated lymph nodes, and in infected ewes, in placentas and aborted fetuses (Alton et al., 1988). However, indirect methods using serological testing are preferred for routine diagnosis (Worthington et al., 1984).

It has been demonstrated that *B. ovis* infection can be eradicated from a flock by systematic testing of rams by serological methods and removal of reactors (Marín et al., 1989; Ris et al., 1984; Spencer and Burgess, 1984).

The widely used agar gel immunodiffusion (AGID), complement fixation (CF) and ELISA tests are recommended as the most efficient. AGID is as sensitive as CF and is easier to run, while ELISA is more sensitive and specific than either CF or AGID. Although a combination of AGID and ELISA seems to yield the best results in terms of sensitivity, the only test prescribed by the Office International des Epizooties for international trade is CF. This test has disadvantages such as the occurrence of anti-complementary and hemolyzed sera and the use of a highly labile reagent as complement.

Because *B. ovis* is a rough strain that cross-reacts with *B. canis*, *B. ovis* antigen has been used for detection of canine serum antibodies against *B. canis*.

Recently, a rapid screening agglutination test (RSAT) and an indirect enzyme-linked immunoassay (IELISA), using antigens prepared with *B. canis* (M–) strain were proposed for diagnosing *B. canis* infection in dogs (Lucero et al., 2002).

Because these tests are relatively easy to run and may have widespread applications, they have been studied for diagnosis of ovine brucellosis. We present data on AGID and IELISA using *B. ovis* antigen and RSAT, 2ME-RSAT and IELISA using *B. canis* antigen.

2. Materials and methods

2.1. Serological tests

For detection of smooth *Brucella* antibodies, the Rose Bengal test (RB) was run as previously described

(Alton et al., 1988) using antigens prepared at ANLIS Dr. C.G. Malbrán with *B. abortus* 1119-3 strain.

We used the following tests for confirmation of rough *Brucella* antibodies.

2.1.1. RSAT

RSAT as screening test, as previously described (Lucero et al., 2002) with serial sera dilutions in order to determine the final titre. Briefly, 10 µl of serum dilution were mixed with 10 µl of antigen on a 25 mm × 75 mm glass slide for 1–2 min and results read under a 10× microscope objective including a control standard serum with a known titre. The 2-mercapto ethanol-RSAT (2ME-RSAT) was done by mixing 25 µl of serum dilution with 25 µl of 0.1 M 2-ME solution; after 1 min 50 µl of antigen was added and read in the same way. The antigen was prepared at ANLIS Dr. C.G. Malbrán using the strain (M–) variant of *B. canis*, kindly provided by Professor L. Carmichael.

2.1.2. IELISA-*B. canis*

The antigen was obtained from (M–) variant of *B. canis* as previously described (Lucero et al., 2002). Briefly, *B. canis* hot saline extract was prepared, then centrifuged at 254 000 × g in a Kontron Instrument Ultra Centrifuge in a TFT 45.94 rotor for 4 h at 4 °C. The pellet was dissolved in PBS pH 7.2, frozen at –20 °C and used 1:2000 after optical density (OD) readings of various antigen dilutions using strong positive, weak positive and negative sera as controls. A lyophilized protein A/G, horseradish peroxidase conjugate was from ImmunoPure, Pierce Lab. and was used at 1:20 000 after testing various working dilution ranges with strong positive, weak positive and negative ovine sera. The antigen diluted in 0.06 M sodium carbonate buffer (pH 9.6) was passively coated onto polystyrene plates (Nunc 2-69620, Denmark) at 50 µl/well, incubated for 18 h at room temperature (RT) and then washed five times in 0.01 M phosphate buffered saline containing 0.05% Tween 20, pH 7.2 (PBS/T). Control and test sera were added at 1:50 in PBS/T, 50 µl/well, for 1 h at RT. After five washes in PBS/T, appropriated diluted protein A/G, horseradish peroxidase conjugated was added, 50 µl/well, and incubated for 1 h at RT. After five washes in PBS/T, the final step was the addition of 100 µl of chromogenic substrate (4.0 mM hydrogen

peroxide and 1.0 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt in 0.05 M citrate buffer, pH 4.5) per well. The plate was shaken continuously on an orbital shaker and after 10 min the OD₄₁₄ was measured in a photometer (Labsystems Multiskan EX microplate reader) by use of 100 µl of chromogenic substrate in a plate as a control for the microplate reader. The test is positive when color develops.

2.1.3. AGID

The gel was prepared by dissolving 1.2 g of Noble agar, 8.5 g of NaCl and merthiolate 1:10 000 in 100 ml of TRIS buffer pH 8.2 in a boiling water bath. On a flat surface, a glass slide was cover with the molten gel (approximately 4 ml); after the gel had solidified, holes were cut using a gel puncher. The holes were 3 mm in diameter and 3 mm apart, arranged in a hexagonal pattern around a central hole, also 3 mm in diameter. Control and test sera were placed in wells with the antigen in the central well. The results were read after incubation for 48 h at RT in a humid chamber. The antigen, a hot saline extract whose major component precipitate with sera to rough strains of *Brucella*, was obtained from *B. ovis* strain REO 198, kindly supplied by SENASA (National Animal Health Service), Argentina, which also provided the control standard serum.

2.1.4. IELISA-*B. ovis*

The antigen, prepared from *B. ovis* strain 11 as described by Vigliocco et al., 1997, was supplied by the CNEA (National Atomic Energy Commission), Argentina and was used 1:2500. A lyophilized protein A/G, horseradish peroxidase conjugated (Immuno-Pure, Pierce Lb.) was used at 1:30 000 after testing various working dilution ranges with strong positive, weak positive and negative ovine sera. The antigen diluted in 0.06 M sodium carbonate buffer (pH 9.6) was passively coated onto polystyrene plates (Nunc 2-69620, Denmark) at 50 µl/well, incubated for 18 h at RT, then washed five times in 0.01 M phosphate buffered saline containing 0.05% tween 20, pH 7.2 (PBS/T). Control and test sera were added at 1:50 in PBS/T, 50 µl/well, for 1 h at RT. After washes, appropriated diluted protein A/G, horseradish peroxidase conjugated was added, 50 µl/well, and incubated for 1 h at RT. After washes the final step was the

addition of 100 µl of the same chromogenic substrate per well. The plate was shaken continuously on an orbital shaker and after 15 min the OD₄₁₄ was measured in a photometer (Labsystems Multiskan EX microplate reader) by use of 100 µl of chromogenic substrate in a plate as a control for the microplate reader. The test is positive when color develops.

2.1.5. Control sera

A control standard serum, provided by the SENASA (Animal Health Service), Argentina, was used in RSAT, 2ME-RSAT and AGID tests. The control serum for the ELISAs was obtained from an experimentally infected ram.

2.2. Sample collection

Animals' blood samples were collected without anticoagulant by jugular venopuncture and kept at RT for 24 h. Sera were separated and stored at -20 °C until testing for detection of *B. ovis* antibodies. Semen samples were collected by electro-ejaculation and taken on sterile cotton swabs inserted into semi solid transport media and cooled to 4 °C, just as the vaginal swabs taken from females. Samples were cultivated in a basal medium with 3–5% of equine serum (free of anti-*B. ovis* antibodies) and antibiotics (vancomycin, 3 mg; colistin methane sulphate, 7.5 mg; nystatin, 12 500 units; nitrofurantoin, 10 mg, per liter) (Alton et al., 1988). Plates were incubated at 37 °C in a 10% CO₂ atmosphere. Colonies were typed by standard procedure (Alton et al., 1988).

2.3. Ovine sera and target population

Fifty-one sera (23 males and 28 females) were from an uninfected flock located in an area southeast of Buenos Aires with prolonged absence of clinical and epidemiological evidence of brucellosis, which tested negative by RB and AGID. This group was used to determine the IELISA-*B. ovis* and IELISA-*B. canis* cut-off values and the diagnostic specificity of IELISA-*B. ovis*, IELISA-*B. canis*, RSAT and 2ME-RSAT. Thirty-two sera (rams) collected from a naturally infected flock with proven *B. ovis* infection detected by clinical examination, bacteriological and classical serological method were supplied by INTA,

Balcarce, Argentina, and were used to calculate the diagnostic sensitivity of IELISA-*B. ovis*, IELISA-*B. canis*, RSAT and 2ME-RSAT. One hundred and forty-two sera were from three flocks suspected of having brucellosis based on clinical examination and some abortions but with negative bacteriological studies. One was a Milschaf and hybrid Corriedale dairy herd in Buenos Aires Province, Argentina used for producing ovine cheese (60 females), another from an area south of Buenos Aires (63 rams), and the third (19 rams) from Uruguay.

2.4. Data analysis

Optical density values from the IELISAs were compared to those obtained with the control serum included in each 96 well plate and a relative percent positivity value (%P) was calculated:

$$\%P = \frac{\text{OD of the test sample}}{\text{OD of the control serum}} \times 100.$$

Diagnostic specificity and sensitivity were determined initially with 95% confidence limits by plotting the data for negative and positive samples on a frequency histogram. Data were then analyzed by receiver-operator characteristics (ROC) (Schoonjans et al., 1995).

3. Results

All 225 sera in this study were negative by RB. The group of 51 sera from the uninfected flock were negative by RSAT and 2ME-RSAT; IELISA-*B. canis* had a mean (%P) value of 21.39 (S.D., 7.66), the AGID was negative and the IELISA-*B. ovis* had a mean (%P) value of 23.05 (S.D., 11.8). Fig. 1 shows the frequency distribution of these sera and a cut-off value of (%P) 36.71 (+2 S.D.) or (%P) 44.37 (+3 S.D.) was empirically determined by ELISA-*B. canis* and (%P) 46.65 (+2 S.D.) and (%P) 58.45 (+3 S.D.) by IELISA-*B. ovis* (Fig. 2).

These cut-off values were adjusted by ROC analysis using 51 negative and 32 positive sera, yielding an IELISA-*B. canis* cut-off value of (%P) 39 and IELISA-*B. ovis* of (%P) 51 with 100% sensitivity and specificity.

See Table 1 for a summary of the 32 positive sera from the infected flock. RSAT detected the 32 positive

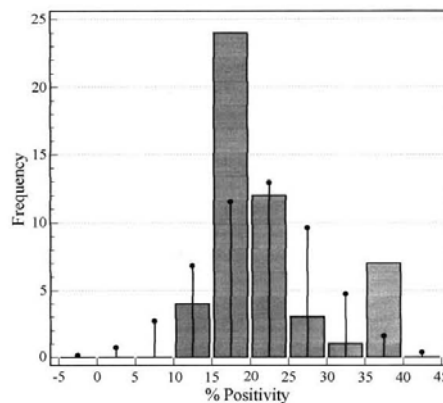


Fig. 1. Frequency distribution of IELISA-*B. canis* in 51 serum samples negative for antibody to *B. ovis*.

sera (100%), 2ME-RSAT 29 (91%), IELISA-*B. canis* 32 (100%), IDGA 29 (97%) and IELISA-*B. ovis* 32 (100%). Clinical examination found lesions of the epididymis in 21 of 30 animals, and *B. ovis* was isolated in four cases.

Of the 142 sera from suspicious flocks (Table 2), 46 were negative and 56 positive in all the tests, 16 were positive by RSAT, IELISA-*B. canis* and IELISA-*B.*

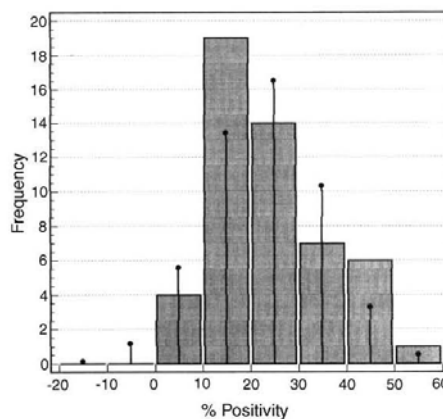


Fig. 2. Frequency distribution of IELISA-*B. ovis* in 51 serum samples negative for antibody to *B. ovis*.

Table 1
Serological, clinical and bacteriological results of 32 ovine (RB negative)

Serum no.	<i>B. canis</i> antigen			<i>B. ovis</i> antigen		Clinical and bacteriological results
	RSAT ^a	2ME-RSAT ^a	IELISA	AGID ^b	IELISA	
1	±	Neg	65	++	95	CL
2	2	Pos	57	Neg	100	CL
3	Pos	Pos±	56	++	96	CL
4	Pos	Pos±	68	++	100	CL
5	2	Pos	90	++	100	NI
6	4	Pos	85	++	100	NI
7	2	Pos±	100	+++	100	CL
8	Pos	Pos±	80	+++	100	CL
9	4	2	67	+++	100	CL
10	Pos	Pos±	100	+++	83	NI
11	Pos	Neg	58	+++	98	CL
12	Pos	Pos±	100	+++	100	CL
13	2	Pos±	100	±	62	CL
14	2	Pos	100	++	98	CL
15	Pos	Pos±	100	++	89	CL
16	±	Pos±	47	++	74	CL
17	±	Neg	62	++	52	CL
18	4	2	80	++	100	NI
19	8	8	87	+++	100	NI
20	2	2	58	+++	100	NI
21	2	Pos	81	+++	99	NI
22	2	Pos	100	+++	100	NI
23	4	Pos	100	+++	100	NI
24	2	Pos	88	+++	87	CL B+
25	4	Pos	96	+++	78	CL
26	16	8	93	+++	77	CL
27	4	2	100	+++	100	CL
28	4	2	99	+++	100	CL B+
29	2	Pos	91	+++	100	CL
30	2	Pos	79	+++	75	CL
31	2	Pos	98	+++	100	B+
32	Pos	Pos±	90	++	100	B+

CL: clinical lesions; B+: *B. ovis* isolation; NI: no information; RSAT: rapid screening agglutination test; 2ME-RSAT: 2-mercapto ethanol-RSAT; IELISA/*B. canis*: cut-off (%P) 39; IELISA/*B. ovis*: cut-off (%P) 51; AGID: agar gel immunodiffusion.

^a Reciprocal of the highest dilution to cause microagglutination.

^b (+, ++, +++, +++) Very weak, weak, moderate and strong positive.

ovis, 20 positive only by RSAT and two positive only by both IELISAs. Clinical examination of 79 animals detected pietin in five cases and orquiepididymitis and monoorchitis in two cases.

4. Discussion

Passive venereal transmission of *B. ovis* via the ewe appears to be a frequent route of infection, but ram to ram transmission is also common (Blasco, 1990).

The detection of genital lesions by palpating the testicles of rams may indicate infection, but this method is not sensitive enough. Our study agrees with previous reports that clinical diagnosis is also extremely unspecific, since other bacteria also cause epididymitis. Of 32 animals in the infected flock, 21 (66%) presented clinical lesions, but of 142 animals from the suspected flock where positive animals were detected, only 79 animals were clinically examined, of which 17 were serologically positive to *B. ovis* and 16 suspected of having brucellosis. Pietin were detected

Table 2
Serological results of 142 ovine sera suspected of having brucellosis caused by *B. ovis*

n	<i>B. canis</i> antigen			<i>B. ovis</i> antigen	
	RSAT	2ME-RSAT	IELISA	AGID	IELISA
56	P	P	P	P	P
7	P	P	P	N	P
2	P	N	P	P	P
7	P	N	P	N	P
9	P	P	N	N	N
2	P	N	N	N	P
11	P	N	N	N	N
1	N	N	P	N	P
1	N	N	N	N	P
46	N	N	N	N	N
142	94	72	73	58	76

P: positive; N: negative.

in five cases (three serologically negative, two weak positive only by RSAT), one ram presented orchiditis (serologically positive) and another, monorquitis (serologically negative).

Although bacteriological diagnosis is recommended as a confirmatory test, this method is inadequate for detection of the disease in large numbers of ovines, since it fails to detect all the infected animals (Jones et al., 1975; Worthington et al., 1985).

Of the serological methods used to detect antibodies to *B. ovis*, IELISA has been shown to be the most sensitive and specific.

For the 51 sera from the uninfected flock, IELISA-*B. ovis* and IELISA-*B. canis* was 100% specific with a cut-off value of (%P) 51 and (%P) 39, respectively; sensitivity for the 32 sera from the infected flock was also 100%.

The study of animals suspected of having brucellosis revealed that 73 were positive for IELISA-*B. canis* and 76 for IELISA-*B. ovis* indicating that *B. ovis* and *B. canis* antigen yielded the same results. The data agree with results published by Nielsen et al. (2004a) using R-RB51 strain as antigen for detection of anti *B. ovis* antibodies.

Although AGID has been shown to be a very simple test, it is not widely used in the field. When we compared RSAT and 2ME-RSAT as screening tests to AGID, these three tests were negative in the group of 51 negative animals; however, of 32 positive animals

RSAT detected 100%, AGID 97% and RSAT-2ME 91%.

The screening tests were run on the 142 animals suspected of having brucellosis, of which 94 were RSAT positive, 72 2ME-RSAT and 58 AGID positive.

Since *B. ovis* shared antigenic components with *B. canis*, it would seem that both strains might be used as an antigen with the same results; however, the *B. canis* (M-) strain variant has the advantage of making the development of a satisfactory antigen for agglutination tests possible. The RSAT antigen is stable for at least 2 years and, when kept in bottles containing sterile glass beads, used to disperse it prior to use, has shown to be a useful antigen. RSAT is a very sensitive screening test whose simplicity and easy interpretation would provide an adequate replacement for AGID, following a study in larger sample, as a screening test for diagnosis of ovine brucellosis caused by *B. ovis*. Although this test has been described using pure serum, serial serum dilution to find a final titre assists follow up of infection in individual animals.

Since IELISA-*B. canis* or IELISA-*B. ovis* yielded the same specificity and sensitivity, they could be used indistinctly as confirmatory test. The standard control serum used on each plate makes it possible to convert the optical density reading to percent positivity. Also, the lyophilized protein A/G, horseradish peroxidase conjugated, that we applied for detection of antibodies to smooth and rough lipopolysaccharide antigens in sera from different animal species (Nielsen et al., 2004b) was a useful detection reagent in both IELISA tests.

Acknowledgments

We are very grateful to Dr. Fernando Paolicchi at the Bacteriology Laboratory, INTA (National Institute of Agricultural and Animal Technology), Balcarce, Dr. Ana Nicola, SENASA (National Animal Health Service), Martinez, and Patricia Silva-Paulo from the CNEA (National Atomic Energy Commission), Ezeiza, Buenos Aires, Argentina, for kindly providing us with sera and antigens, and to Dr. Klaus Nielsen from the Canadian Food Inspection Agency, Animal Research Institute, Ontario, Canada, for reviewing the manuscript.

References

- Alton, G.G., Jones, L.M., Angus, R.D., Verger, J.M., 1988. Serological methods. Techniques for the Brucellosis Laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France, pp. 157–167.
- Blasco, J.M., 1990. *Brucella ovis*. In: Nielsen, K., Duncan, J.R. (Eds.), Animal Brucellosis. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 351–378.
- Jones, L.M., Dubray, G., Marley, J., 1975. Comparison of methods of diagnosis of *Brucella melitensis*. Ann. Rech. Vet. 6, 11–12.
- Lucero, N.E., Escobar, G.I., Ayala, I., Lopez, G., 2002. Sensitivity and specificity of an indirect enzyme-linked immunoassay for the diagnosis of *Brucella canis* infection in dogs. J. Med. Microbiol. 51, 656–660.
- Marín, C., Jimenez de Bagues, M., Blanco, J., Gamazo, C., Moriyon, I., Díaz, R., 1989. Comparison of three serological tests for *Brucella ovis* infection of rams using different antigenic extracts. Vet. Rec. 125, 504–508.
- Nielsen, K., Smith, P., Conde, S., Draghi de Benitez, G., Gall, D., Halbert, G., Kenny, K., Massengill, C., Muenks, Q., Rojas, X., Perez, B., Samartino, L., Silva, P., Tollersrud, T., Jolley, M., 2004a. Rough lipopolysaccharide of *Brucella abortus* RB51 as a common antigen for serological detection of *B. ovis*, *B. canis*, and *B. abortus* RB51 exposure using indirect enzyme immunoassay and fluorescence polarization assay. J. Immunoassay Immunochem. 27 (25(2)), 171–182.
- Nielsen, K., Smith, P., Yu, W., Nicoletti, P., Elzer, P., Vigliocco, A., Silva, P., Bermudez, R., Renteria, T., Moreno, F., Ruiz, A., Massengill, C., Muenks, Q., Kenny, K., Tollersrud, T., Samartino, L., Conde, S., Draghi De Benitez, G., Gall, D., Perez, B., Rojas, X., 2004b. Enzyme immunoassay for the diagnosis of brucellosis: chimeric protein A–protein G as a common enzyme labeled detection reagent for sera for different animal species. Vet. Microbiol. 21 (101(2)), 123–129.
- OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, 2000. Ovine epididymitis (*Brucella ovis*), Office International des Epizooties, fourth ed. Paris, pp. 1–14 (Chapter 2.4.1).
- Ris, D., Hamel, K., Long, D., 1984. Comparison of an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) with the cold complement fixation test for the serodiagnosis of *Brucella ovis* infection. N. Z. Vet. J. 32, 18–20.
- Schoonjans, F., Zalata, A., Depuydt, C.E., Comhaire, F.H., 1995. MedCalc: a new computer program for medical statistics. Comp. Meth. Progr. Biomed. 48, 257–262.
- Spencer, T., Burgess, G., 1984. Enzyme linked immunosorbent assay for *Brucella ovis* specific antibody in ram sera. Res. Vet. Sci. 36, 194–198.
- Vigliocco, A.M., Silva Paulo, P.S., Mestre, J., Briones, G.C., Draghi, G., Tossi, M., Nielsen, K., 1997. Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of ovine antibody to *B. ovis*. Vet. Microbiol. 54, 357–368.
- Worthington, R.W., Weddell, W., Penrose, M.E., 1984. A comparison of three serological tests for diagnosis of *B. ovis* infection in rams. N. Z. Vet. J. 32, 58–60.
- 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. N. Z. Vet. J. 33, 84–86.



Available online at www.sciencedirect.com



**veterinary
microbiology**

Veterinary Microbiology xxx (2006) xxx–xxx

www.elsevier.com/locate/vetmic

Short communication

Detection of antibodies to *Brucella ovis* in sheep milk using *B. ovis* and *B. canis* antigen

G. López^a, G.I. Escobar^b, S.M. Ayala^b, N.E. Lucero^{b,*}

^a *Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Lomas de Zamora, Ruta 4 Km 2.5, LLAVALLOL, Buenos Aires, Argentina*

^b *National Laboratories and Institutes of Health Administration "Dr. C.G. Malbrán" (ANLIS), Avda. Velez Sarsfield 563, 1281 Buenos Aires, Argentina*

Received 20 February 2006; received in revised form 21 March 2006; accepted 24 March 2006

Abstract

The diagnostic techniques most widely used for detecting brucellosis caused by *Brucella ovis* are serological tests such as complement fixation (CFT), agar gel immunodiffusion (AGID), and ELISAs. However, to our knowledge, milk tests, with the advantage that samples may be taken in a non invasive manner, have not been investigated as diagnostic tools. We studied 144 samples of milk and sera from lactating ewes, comparing bacteriological studies, serological and milk tests using *Brucella canis* and *B. ovis* antigens. A group of 75 ewes in an uninfected flock were serologically negative to rapid slide agglutination test (RSAT), indirect ELISA (IELISA)-*B. canis*, AGID and IELISA-*B. ovis*. The milk of these ewes had an IELISA-*B. canis* mean (%P) value of 16.18 (S.D. 5.63), while the IELISA-*B. ovis* had a mean (%P) value of 12.52 (S.D. 4.94). A cut-off value of (%P) 27.44 (+2 S.D.) or (%P) 33 (+3 S.D.) was determined by milk-ELISA-*B. canis* and (%P) 22.4 (+2 S.D.) and (%P) 27.34 (+3 S.D.) by milk-IELISA-*B. ovis*. These cut-off values were adjusted by receiver–operator characteristics (ROC) analysis using 23 positive samples from infected ewes, which indicated a milk-IELISA-*B. canis* cut-off value of (%P) 33 and milk-IELISA-*B. ovis* of (%P) 26 with 100% sensitivity and specificity. Based on our results, we propose that, following a study of a larger number of samples, the milk-IELISA-*B. canis* could be considered a suitable test for the diagnosis of *B. ovis* brucellosis in lactating ewes.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Brucellosis; Sheep; Diagnosis; *Brucella ovis*; Milk-ELISA

1. Introduction

Brucella ovis produces a clinical or sub-clinical disease in sheep, characterised by genital lesions in rams and placentitis in ewes. Passive venereal transmission via the ewe appears to be a frequent

* Corresponding author. Tel.: +54 11 4301 7801; fax: +54 11 4303 2382.

E-mail address: nidia@elsitio.net (N.E. Lucero).

route of infection. Infected ewes may excrete *B. ovis* in vaginal discharges and milk, so that ewe to ram and lactating ewe to lamb transmission could also be determinant mechanisms of infection (OIE, 2004).

The disease causes considerable economic loss to animal owners in countries where the disease has been reported.

The diagnostic techniques most widely used are serological tests such as complement fixation (CFT), agar gel immunodiffusion (AGID), and ELISAs (Myers et al., 1972; Ris et al., 1984; Worthington et al., 1984; Marin et al., 1989; Vigliocco et al., 1997; OIE, 2004).

The milk tests, whose advantage is that samples may be taken in a non invasive manner, have not been investigated for detection of antibodies anti *B. ovis*, although tests to detect antibodies to *Brucella abortus* in cow milk and to *Brucella melitensis* in sheep milk have been reported (Heck et al., 1980; Alton et al., 1988; Kerkhofs et al., 1990; Biancifiori et al., 1996; Nielsen et al., 1996; Chand et al., 2004, 2005a,b).

Also, Nielsen et al. (2004) have demonstrated that rough lipopolysaccharide of *B. abortus* RB 51 could be used as antigen for detection of antibodies against *B. ovis*, *B. canis* and *B. abortus* RB51 by ELISA and fluorescence polarization assay. More recently, other authors have reported that since *B. ovis* shares antigenic components with *B. canis* it seems that this strain could be used as antigen to detect antibodies to *B. ovis* with the same results (López et al., 2005).

The advantage of the antigen prepared with *B. canis* is that this strain does not require addition of serum to basal media or of CO₂ to the atmosphere during incubation.

We report data on milk-IELISA compared to serum-IELISA for diagnosing *B. ovis* infection in sheep using *B. ovis* and *B. canis* antigens.

2. Materials and methods

2.1. Serological tests

2.1.1. Rose Bengal test (RB)

It was run as described previously (Alton et al., 1988) using antigens prepared at the National Laboratories and Institutes of Health Administration “Dr. C.G. Malbrán” (ANLIS) with *B. abortus* 1119-3 strain.

2.1.2. Rapid slide agglutination test (RSAT)

It was used for screening as described previously (López et al., 2005). The antigen was prepared at ANLIS using the strain (M–) variant of *B. canis*.

2.1.3. Indirect ELISA (IELISA)-*B. canis*

This antigen was obtained from the (M–) variant of *B. canis* as described previously (Lucero et al., 2002) and was used 1:2000. The lyophilized protein A/G, horseradish peroxidase conjugated was obtained from ImmunoPure, Pierce Lab and was used 1:20,000 after testing various working dilution ranges with strong positive, weak positive and negative ovine sera. The antigen diluted in 0.06 M sodium carbonate buffer (pH 9.6) was passively coated onto polystyrene plates (Nunc 2-69620, Denmark), 50 µl/well, incubated for 18 h at room temperature (RT) and then hand washed five times in 0.01 M phosphate buffered saline containing 0.05% Tween 20, pH 7.2 (PBS/T). Control and test sera were added 1:50 in 15 mM EDTA/EGTA in PBS/T, 50 µl/well, for 1 h at RT. After five washes in PBS/T, protein A/G horseradish peroxidase conjugated was added, 50 µl/well, and incubated for 1 h at RT. Finally, after five washes in PBS/T, 100 µl of chromogenic substrate (4.0 mM hydrogen peroxide and 1.0 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt in 0.05 M citrate buffer, pH 4.5) per well was added. The plate was shaken continuously on an orbital shaker and after 10 min the OD₄₁₄ was measured in a photometer (Labsystems Multiskan EX microplate reader) using 100 µl chromogenic substrate in a plate as a control for the microplate reader. The test is positive when %P is 39 or more (López et al., 2005).

2.1.4. AGID

The gel was prepared by dissolving 1.2 g Noble agar, 8.5 g NaCl and merthiolate 1:10,000 in 100 ml Tris buffer pH 8.2 in a boiling water bath. On a flat surface, a glass slide was covered with the liquid gel (approximately 4 ml), and after the gel had solidified holes were cut with a gel puncher. Holes were 3 mm diam and 3 mm apart, arranged in a hexagonal pattern around a central hole, also 3 mm diam. Control (SENASA, Argentina, Lot 4-04) and test sera were placed in outer wells with the antigen (SENASA, Argentina, Lot 01-05) in the central well. Results were

read after incubation for 48 h at RT in a humid chamber (OIE, 2004).

2.1.5. IELISA-*B. ovis*

The antigen, prepared from *B. ovis* strain 11 as described by Vigliocco et al. (1997), was supplied by CNEA, Argentina and was used 1:2500. A lyophilized protein A/G, horseradish peroxidase conjugated (ImmunoPure, Pierce Lab) was used 1:25,000 after testing various working dilution ranges with strong positive, weak positive and negative ovine sera. The antigen diluted in 0.06 M sodium carbonate buffer (pH 9.6) was passively coated onto polystyrene plates (Nunc 2-69620, Denmark), 50 μ l/well, incubated for 18 h at RT, then hand washed five times in 0.01 M phosphate buffered saline containing 0.05% Tween 20, pH 7.2 (PBS/T). Control and test sera were added 1:50 in 15 mM EDTA/EGTA in PBS/T, 50 μ l/well, for 1 h at RT. After five washes, protein A/G horseradish peroxidase conjugated was added, 50 μ l/well, and incubated for 1 h at RT. Finally, following washes, 100 μ l of the same chromogenic substrate per well was added. The plate was shaken continuously on an orbital shaker and after 15 min the OD₄₁₄ was measured in a photometer (Labsystems Multiskan EX microplate reader), using 100 μ l chromogenic substrate in a plate as control for the microplate reader. The test is positive when %P is 51 or more (López et al., 2005).

2.2. Milk tests

The milk-IELISA-*B. canis* and milk-IELISA-*B. ovis* tests were run by the same procedure as the sera except that milk was diluted 1:2 for testing. Controls were strong positive (naturally infected sheep, detected by serological and bacteriological methods), weak positive (sheep from a naturally infected flock with weak serological titer) and negative (sheep from an uninfected flock with no clinical, epidemiological or bacteriological evidence of brucellosis) milk samples were added 1:2 in 15 mM EDTA/EGTA in PBS/T, 50 μ l/well.

2.3. Sample collection

Animals' blood and milk samples were collected simultaneously. Sera were separated and stored at -20°C until testing for detection of *B. ovis* antibodies.

All milk samples were taken after washing and drying the whole udder and disinfecting the teats. The first stream was discarded and about 15 ml of milk were collected in a sterile sealed tube. For antibody assays 1 ml was separated in a vial, in a class II biological safety cabinet, and stored at -20°C without preservation. Then, milk samples were centrifuged at $2000 \times g$ for 15 min. Cream and deposit were spread separately on a basal medium with 3–5% equine serum (free of anti-*B. ovis* antibodies) and antibiotics (vancomycin 3 mg, colistin methane sulphate 7.5 mg, nystatin 100,000 units, nitrofurantoin 10 mg and cycloheximide 100 mg/l (Alton et al., 1988; OIE, 2000). Plates were incubated at 37°C in air with 10% CO₂ added. Colonies were typed at ANLIS by standard procedure (Alton et al., 1988).

2.4. Ovine sera and milk and target population

Seventy five sera and milk samples were taken from an uninfected flock located in an area southeast of Buenos Aires with no clinical, epidemiological or bacteriological evidence of brucellosis, whose sera tested negative by RB, RSAT, IDGA, IELISA, *B. canis* and IELISA *B. ovis*. This group was used to ascertain the milk-IELISA-*B. ovis* and milk-IELISA-*B. canis* cut-off values as well as diagnostic specificity.

Twenty-three samples from five positive sheep were used to calculate the diagnostic sensitivity of the milk-IELISA-*B. ovis* and milk-IELISA-*B. canis*.

Three were from a group of sheep experimentally inoculated i.v. late in the first pregnancy with 1×10^6 CFU/ml *B. ovis* isolated from a naturally infected ram. The milk and sera from these three lactating sheep were supplied by INTA-Balcarce.

Two ewes were from a naturally infected flock detected by serological (RSAT, serum-IELISA-*B. canis*, AGID, serum-IELISA-*B. ovis*) and bacteriological methods.

Sixty-four sheep were from a flock, located in Buenos Aires province, Argentina, suspected of having brucellosis based on clinical examination of some rams.

2.5. Data analysis

Optical density (OD) values of milk-IELISAs were compared to those for the control milk included in

each 96 well plate and a relative percent positivity value (%P) was calculated: $(\%P) = [OD_{\text{test sample}} / OD_{\text{control milk}}] \times 100$.

Diagnostic specificity and sensitivity were determined initially with 95% confidence limits by plotting the data for negative and positive samples on a frequency histogram. Data were then analyzed by receiver–operator characteristics (ROC) (Schoonjans et al., 1995).

3. Results

All 144 sera included in this study were negative by RB.

The group of 75 sera from ewes of an uninfected flock were negative by RSAT, IELISA-*B. canis*, AGID and IELISA *B. ovis*. The 75 samples of milk from these ewes, from which no *Brucella* were isolated, had an IELISA-*B. canis* mean (%P) value of 16.18 (S.D. 5.63) and IELISA-*B. ovis* had a mean (%P) value of 12.52 (S.D. 4.94). A cut-off value of (%P) 27.44 (+2 S.D.) or (%P) 33 (+3 S.D.) was determined by milk-IELISA-*B. canis* and (%P) 22.4 (+2 S.D.) and (%P) 27.34 (+3 S.D.) by milk-IELISA-*B. ovis*.

These cut-off values were adjusted by ROC analysis using 75 negative and 23 positive samples, yielding a milk-IELISA-*B. canis* cut-off value of (%P) 33 and milk-IELISA-*B. ovis* of (%P) 26, with 100% sensitivity and specificity. Fig. 1 shows the interactive dot diagram of milk-IELISA-*B. canis* (A) and milk-IELISA-*B. ovis* (B).

See Table 1 for a summary of the tests of milk and sera from infected ewes. From sheep #2 only the four later samples were included for ROC analysis because at this time RSAT were positive and serum-IELISA with both antigens began to increase slowly.

RSAT, serum-IELISA-*B. canis* and serum-IELISA-*B. ovis* detected the 23 positive sera (100%) and IDGA 17 (73%). Milk-IELISA-*B. canis* and milk-IELISA-*B. ovis* detected the 23 positive milk samples (100%).

Eleven *B. ovis* were isolated from the ewes: four times in ewe 1; twice in ewe 3; three times in ewe 4 and once in ewe 5.

Of the 64 samples from the suspect flock (data not shown), 11 were detected by milk-IELISA-*B. canis*

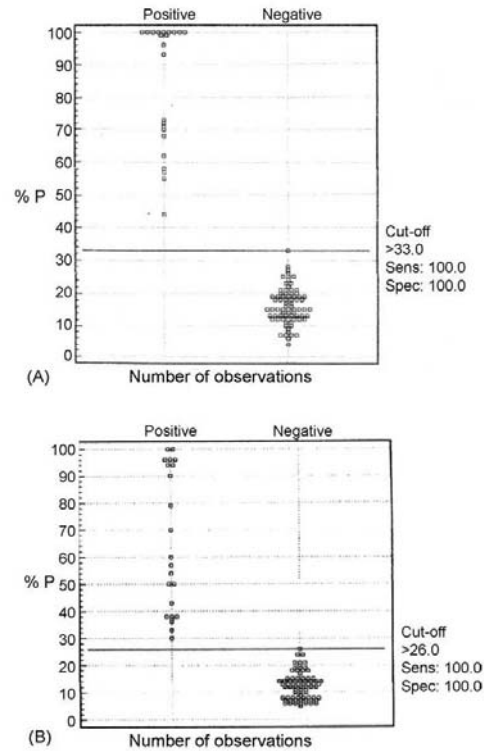


Fig. 1. Interactive dot diagram of milk-IELISA-*B. canis* (A) and milk-IELISA-*B. ovis* (B) results from 75 negative and 23 positive milk samples.

and milk-IELISA-*B. ovis*, 3 and 2 were positive only to serum-IELISA-*B. canis* and serum-IELISA-*B. ovis*, respectively, and 23 were negative to all tests.

4. Discussion

Brucellosis in ruminants caused by *B. ovis* is characterised by reduced fertility in rams, abortions in ewes and perinatal mortality.

Diagnosis based on clinical examination is not sensitive enough and bacteriological studies are inadequate for detection of the disease in large

Table 1
Bacteriological studies and tests to detect anti *B. ovis* antibodies in milk and sera of five lactating sheep

Sheep no.	Days since first sample	<i>B. canis</i> antigen			<i>B. ovis</i> antigen			Isolation
		Serum-RSAT	Serum-IELISA	Milk-IELISA	Serum-AGID ^a	Serum-IELISA	Milk-IELISA	
1 ^b	0	Pos+/-	34	62	Neg	32	50	
	17	Pos+/-	44	70	Neg	43	70	
	25	Pos	72	100	Pos+++	49	90	<i>B. ovis</i>
	30	Pos	74	100	Pos+++	60	94	<i>B. ovis</i>
	37	Pos	73	100	Pos+++	65	94	
	44	Pos	68	100	Pos++	69	96	<i>B. ovis</i>
	51	Pos	65	100	Pos++	65	54	<i>B. ovis</i>
2 ^b	0	Neg	37	29	Neg	44	17	
	17	Neg	36	20	Neg	43	12	
	25	Pos	36	22	Neg	42	13	
	30	Pos	38	57	Neg	48	36	
	37	Pos	56	58	Neg	68	37	
	44	Pos	68	55	Pos+++	63	50	
	51	Pos	65	68	Pos+++	53	79	
3 ^b	0	Pos	52	44	Pos+++	89	30	
	17	Pos	50	72	Pos+++	66	33	
	25	Pos	64	71	Pos+++	98	38	
	30	Pos	85	73	Pos+++	100	38	
	37	Pos	94	93	Pos+++	95	38	<i>B. ovis</i>
	44	Pos	93	100	Pos+++	100	60	<i>B. ovis</i>
	51	Pos	88	99	Pos++	78	100	
4	0	Pos	100	99	Pos+++	100	96	<i>B. ovis</i>
	20	Pos	100	96	Pos+++	100	96	<i>B. ovis</i>
	45	Pos	88	100	Pos+++	100	100	<i>B. ovis</i>
5	0	Pos	100	100	Neg	89	43	<i>B. ovis</i>
	15	Pos	100	100	Neg	85	57	

RSAT, rapid slide agglutination test; Pos, positive; Neg, negative; Pos+/-, weakly positive; serum-IELISA-*B. canis*, cut-off (%P) 39; serum-IELISA-*B. ovis*, cut-off (%P) 51; AGID, agar gel immunodiffusion.

^a (+, +++) weak and moderate positive.

^b Sheep experimentally inoculated via IV with 1×10^6 CFU/ml of *B. ovis*.

numbers of animals, the reasons for which serological tests appear to be useful for routine controls.

Of the serological methods used to detect antibodies to *B. ovis*, IELISA has been shown to be the most sensitive and specific, also using *B. canis* or *B. ovis* antigens (López et al., 2005).

These tests have been shown to be equally effective in determining *Brucella* antibodies in bovine milk and serum (Nielsen et al., 1996; Alton et al., 1988; Heck et al., 1980).

Milk is an easily obtainable and inexpensive clinical sample; the stage of lactation does not seem to interfere with the test; however, to our knowledge, the use of milk has not been investigated for diagnosis of brucellosis caused by *B. ovis*.

We studied 144 lactating sheep, collecting milk and blood simultaneously.

With the 75 sheep from the uninfected flock whose sera tested negative by RSAT, AGID, IELISA-*B. ovis* and IELISA-*B. canis* presented 100% specificity with a cut-off value of (%P) 33 to milk-IELISA-*B. canis* and (%P) 26 to milk-IELISA-*B. ovis*, respectively (Fig. 1).

Sensitivity was calculated with 23 samples from five positive ewes, which were 100% positive to milk-IELISA with both antigens (Table 1).

The three sheep experimentally inoculated with *B. ovis* late in their first pregnancy gave birth to lambs seven days after inoculation and their serum and milk were sampled from eight days after delivery. Sheep #3 had positive serum and milk from the first sample.

Sheep #1 and #2 became positive to all tests 25 and 30 days after dropping lambs, respectively.

Five lambs dropped by these three ewes were tested serologically weekly, starting one month after birth. All were negative to RSAT, AGID, IELISA-*B. canis* and IELISA-*B. ovis* sera tests and continued to test negative one month later.

Sheep #4 and #5, naturally infected, were strongly positive to all tests of serum and milk. Milk from sheep #4 had a titer of 1:1600 to both milk-IELISA-*B. ovis* and milk-IELISA-*B. canis*, and was selected as a positive control, confirming previous reports (López et al., 2005) that *B. ovis* and *B. canis* antigens yielded the same results. Serum of sheep #4 was 1:600, while sheep #5 tested milk-IELISA 1:200 and serum-IELISA 1:800.

Of the 64 samples from the suspect flock (data not shown), 23 and 17 were milk-IELISA-*B. canis* and milk-IELISA-*B. ovis* positive, respectively; however only 3 were serum-IELISA-*B. canis* and 2 serum-IELISA-*B. ovis* positive. This difference could be due to the dilution of serum (1:50) and milk (1:2), Chand et al. (2005a,b) reported that antibody levels were about 5–10 times higher in serum than milk of ewes tested for diagnosis of *B. melitensis* infection.

From the three sheep experimentally infected two were milk-IELISA positive but not serum-IELISA with both antigens. Re-sampling could be indicated in all suspect ewes if milk-IELISA tests positive and serum-IELISA negative.

When we compared RSAT to AGID for serum screening (Table 1), the latter was not sensitive enough. The four sera positive to AGID, also positive to RSAT (from the suspect flock), were probably a false positive reaction, since they tested negative to serum and milk IELISA tests.

Since *B. ovis* shares antigenic components with *B. canis*, it would seem that both strains might be used as antigen with the same results; however, the advantage of the *B. canis* (M-) strain variant is that it requires neither addition of serum to basal media nor of CO₂ to the atmosphere during incubation.

Considering that concentrations of IgG in milk have been reported to correlate with serum levels (Caffin et al., 1983; Caffin and Poutrel, 1988; Smith et al., 1989), this type of sampling also makes it easy to apply the test to large numbers of ewes.

On the basis of our results, we propose that following the study of a larger number of samples the

milk-IELISA-*B. canis* test could be considered a convenient test for the diagnosis of *B. ovis* brucellosis in lactating ewes.

Acknowledgments

We are very grateful to Mrs. Silvia Barboza for her assistance with graphics, Dr. Fernando Paolicchi at the Bacteriology Laboratory, National Institute of Agricultural and Animal Technology, Balcarce, for kindly providing us with sera and milk samples, and to Dr. Klaus Nielsen from the Canadian Food Inspection Agency, Animal Research Institute, Ontario, Canada, for reviewing the manuscript.

References

- Alton, G.G., Jones, L.M., Angus, R.D., Verger, J.M., 1988. Serological methods. In: Techniques for the Brucellosis Laboratory, Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France, pp. 157–167.
- Biancifiore, F., Nannini, D., Di Matteo, A., Belfiore, P., 1996. Assessment of an indirect ELISA in milk for the detection of ovine brucellosis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 19, 17–24.
- Caffin, J.P., Poutrel, B., Rainard, P., 1983. Physiological and pathological factors influencing bovine immunoglobulin G₁ concentration in milk. *J. Dairy Sci.* 66, 2161–2166.
- Caffin, J.P., Poutrel, B., 1988. Physiological and pathological factors influencing bovine immunoglobulin G₂ concentration in milk. *J. Dairy Sci.* 71, 2035–2043.
- Chand, P., Sadana, J.R., Malhotra, A.K., Poonia, J.S., 2004. Indirect ELISA for the detection of *Brucella melitensis* antibodies in sheep milk. *Vet. Rec.* 155, 639–641.
- Chand, P., Rajpurohit, A.K., Malhotra, A.K., Poonia, J.S., 2005a. Comparison of milk-ELISA and serum-ELISA for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep milk. *Vet. Rec.* 155, 639–641.
- Chand, P., Rajpurohit, A.K., Malhotra, A.K., Poonia, J.S., 2005b. Comparison of milk-ELISA and serum-ELISA for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep milk. *Vet. Microbiol.* 108, 305–311.
- Heck, F.C., Williams, J.D., Pruett, J., Sanders, R., Zink, D.L., 1980. Enzyme linked immunosorbent assay for detecting antibodies to *Brucella abortus* in bovine milk and serum. *Am. J. Vet. Res.* 41, 2082–2084.
- Kerkhofs, P., Botton, Y., Thiange, P., Dekeyser, P., Limet, J.N., 1990. Diagnosis of bovine brucellosis by enzyme immunoassay of milk. *Vet. Microbiol.* 24, 73–80.
- López, G., Ayala, S.M., Escobar, G.I., Lucero, N.E., 2005. Use of *Brucella canis* antigen for detection of ovine serum antibodies against *B. ovis*. *Vet. Microbiol.* 105, 181–187.

- Lucero, N.E., Escobar, G.I., Ayala, S.M., López, G., 2002. Sensitivity and specificity of an indirect enzyme-linked immunoassay for the diagnosis of *Brucella canis* infection in dogs. *J. Med. Microbiol.* 51, 656–660.
- Marin, C., Jimenez de Bagues, M., Blanco, J., Gamazo, C., Moriyon, I., Diaz, R., 1989. Comparison of three serological tests for *Brucella ovis* infection of rams using different antigenic extracts. *Vet. Rec.* 125, 504–508.
- Myers, D.M., Jones, L.M., Varela Diaz, V., 1972. Studies of antigens for complement fixation and gel diffusion tests in the diagnosis of infections caused by *Brucella ovis* and other *Brucella*. *Appl. Microbiol.* 23, 894–902.
- Nielsen, K., Smith, P., Gall, D., Perez, B., Cosma, C., Mueller, P., Trotter, J., Cote, G., Boag, L., Bosse, J., 1996. Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of antibody to *Brucella abortus* in milk. *Vet. Microbiol.* 52, 165–173.
- Nielsen, K., Smith, P., Conde, S., Draghi de Benitez, G., Gall, D., Halbert, G., Kenny, K., Massengill, C., Muenks, Q., Rojas, X., Perez, B., Samartino, L., Silva, P., Tollersrud, T., Jolley, M., 2004. Rough lipopolysaccharide of *Brucella abortus* RB51 as a common antigen for serological detection of *B. ovis*, *B. canis*, and *B. abortus* RB51 exposure using indirect enzyme immunoassay and fluorescence polarization assay. *J. Immunoassay Immunochem.* 25, 171–182.
- OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, 2000. *Ovine Epididymitis (Brucella ovis)*, Office International des Epizooties, 4th ed. Paris, pp.1–14 (chapter 2.4.1).
- OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, 2004. *Ovine Epididymitis (Brucella ovis)*, Office International des Epizooties, 5th ed. Paris, pp.1–14 (chapter 2.4.1).
- Ris, D., Hamel, K., Long, D., 1984. Comparison of an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) with the cold complement fixation test for the serodiagnosis of *Brucella ovis* infection. *N. Z. Vet. J.* 32, 18–20.
- Schoonjans, F., Zalata, A., Depuydt, C.E., Comhaire, F.H., 1995. MedCalc: a new computer program for medical statistics. *Comp. Methods Prog. Biomed.* 48, 257–262.
- Smith, B.P., Oliver, D.G., Singh, P., Dilling, G., Marvin, P.A., Ram, B.P., Jang, L.S., Sharkov, N., Orsborn, J.S., et al., 1989. Detection of Salmonella Dublin mammary gland infection in carrier cows, using an enzyme-linked immunosorbent assay for antibody in milk and serum. *Am. J. Vet. Res.* 50, 1352–1360.
- Vigliocco, A.M., Silva Paulo, P.S., Mestre, J., Briones, G.C., Draghi, G., Tossi, M., Nielsen, K., 1997. Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of ovine antibody to *B. ovis*. *Vet. Microbiol.* 54, 357–368.
- Worthington, R.W., Weddell, W., Penrose, M.E., 1984. A comparison of three serological tests for diagnosis of *B. ovis* infection in rams. *N. Z. Vet. J.* 32, 58–60.