



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**EVALUACIÓN DIAGNÓSTICA DE EPIDIDIMITIS CONTAGIOSA POR
BRUCELLA OVIS EN CARNEROS TEXEL EN UN ESTABLECIMIENTO
COMERCIAL**

por

**Ignacio PUERTO da SILVA
Rodrigo Guzmán NOVIS PEREIRA**

TESIS DE GRADO presentada como
uno de los requisitos para obtener el
título de Doctor en Ciencias
Veterinarias
Orientación: Producción Animal

MODALIDAD: Estudio de Caso

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2018**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis aprobada por:

Presidente:

Dr. Luis Cal

Segundo miembro (Tutor):

Dra. Fiorella Scaglione

Tercer miembro:

Dr. Gonzalo Rosés

Cuarto miembro (co-Tutor):

Dra. María Inés Cantou

Fecha de aprobación:

18/12/2018

Autores:

Ignacio Puerto da Silva

Rodrigo Guzmán Novis Pereira

AGRADECIMIENTOS

- A las Dras. Fiorella Scaglione y María Inés Cantou, del Departamento de Rumiantes y Suinos, Facultad de Veterinaria (UdelaR), por ser nuestras tutoras, por su dedicación y esfuerzo para con nosotros.
- A la Dra. Daniela Crespi, del Departamento de Reproducción, Facultad de Veterinaria (UdelaR), por realizar la extracción seminal.
- Al Dr. Danilo Fila, del Departamento de Reproducción, Facultad de Veterinaria (UdelaR), por realizar la evaluación seminal y proporcionarnos bibliografía.
- Al Dr. Álvaro Núñez, director del Di.La.Ve. por facilitar el procesamiento de las muestras.
- A la Dra. Florencia Pieruccioni, del Departamento de Patología (Di.La.Ve.), por realizar el estudio histopatológico.
- A las Bres. Magdalena Domínguez, Micaela De León y Andrea Fonseca, por la ayuda prestada en los trabajos de campo.
- A la Dra. Cecilia Abreu por el apoyo brindado.
- Al personal del establecimiento por la ayuda brindada en los trabajos de campo.
- Al personal de la Biblioteca de Facultad de Veterinaria por la ayuda en la búsqueda y corrección de bibliografía.
- A nuestras familias por haber confiado en nosotros, por el esfuerzo realizado para poder llevar a cabo la carrera y el apoyo constante
- A todos nuestros compañeros y amigos por estar siempre presentes.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE CUADROS	5
LISTA DE FIGURAS	6
1. RESUMEN	6
2. SUMMARY	7
3. INTRODUCCIÓN	9
3.1. Etiología	9
3.2. Epidemiología	10
3.3. Patogenia	11
3.4. Sintomatología	11
3.5. Diagnóstico	12
3.5.1. Diagnóstico Clínico	12
3.5.2. Diagnóstico de Laboratorio	14
3.5.3. Diagnóstico Anatomopatológico e Histopatológico	19
3.5.4. Diagnóstico Diferencial	20
4. TRATAMIENTO Y CONTROL	24
5. OBJETIVOS	25
5.1. Objetivo general:	25
5.2. Objetivos específicos:	25
6. MATERIALES Y MÉTODOS	26
7. RESULTADOS	30
8. DISCUSIÓN	34
9. CONCLUSIONES	35
10. BIBLIOGRAFÍA	36

LISTA DE CUADROS

Número de cuadro	Página
1. Escala subjetiva de tono testicular.	13
2. Concentración del semen del carnero valorada mediante la consistencia.	15
3. Determinación de la puntuación del movimiento ondulado de los espermatozoides.	16
4. Principales agentes infecciosos causantes de aborto ovino.	23
5. Identificación de los animales y edad.	26
6. Estructura de las categorías reproductivas y porcentaje de señalada en los años 2016, 2017 y 2018.	26
7. Resultados del examen clínico.	30
8. Resultados serológicos.	30
9. Resultados de la evaluación seminal.	31
10. Alteraciones patológicas.	32
11. Cultivo bacteriológico.	33

LISTA DE FIGURAS

Número de figura	Página
1. Carneros evaluados.	26
2. Extracción de la muestra seminal.	27
3. Carnero N° 2022. Testículos sin (A) y con (B) presencia de la túnica vaginal (izquierda). Adherencias entre la túnica vaginal y la albugínea del testículo (derecha).	28
4. Carnero N° 2022.	30
5. Colecta de semen insuficiente del carnero N° 2364 (izquierda). Anormalidades en semen del carnero N° 2365, se observa cola enrollada y alteraciones de la pieza intermedia (derecha).	31
6. Anatomía Patológica e histopatología del carnero N° 2022.	32
7. Testículo derecho del carnero N° 2364.	33
8. Testículo derecho del carnero N° 2365.	33

1. RESUMEN

La brucelosis ovina es una enfermedad infectocontagiosa de origen bacteriano, causada por *Brucella ovis* (*B. ovis*) que afecta principalmente al carnero, en el cual las manifestaciones más importantes son epididimitis y disminución de la calidad espermática, produciendo en la oveja una sintomatología más leve. La importancia de esta enfermedad radica en la disminución de los índices reproductivos, el refugio de carneros, así como restricciones comerciales.

A nivel nacional el método diagnóstico utilizado con mayor frecuencia es inmuno difusión en gel de agar (IDGA), pero existen alternativas con mayor sensibilidad como análisis de inmunoadsorción ligada a enzimas (ELISA) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Hasta el momento no se ha descrito un tratamiento efectivo y no existe una vacuna con eficacia reconocida, por lo cual es fundamental el control eliminando los positivos y la prevención evitando el ingreso de animales portadores.

En el presente estudio de caso se realizó la exploración clínica de 5 carneros de un establecimiento comercial, identificándose dos animales con asimetría epididimaria. En base a estos hallazgos se decidió realizar a la totalidad de los carneros, evaluación seminal y serología para confirmar la presencia de *B. ovis*. Algunos de ellos presentaron alteraciones espermáticas y 3 individuos fueron positivos a serología, de los cuales uno no presentaba sintomatología clínica. Se realizó la orquiectomía bilateral a 4 carneros, en algunos se observaron alteraciones macroscópicas características de la enfermedad, las cuales se confirmaron por anatomía patología e histopatología. Mediante cultivo bacteriológico, se aisló *B. ovis* de los 3 positivos a IDGA y también de uno de los negativos. Se concluyó que realizar el diagnóstico clínico no es suficiente, siendo necesario identificar mediante análisis de laboratorio a los individuos portadores. La técnica que se utiliza a nivel oficial es IDGA, pero para garantizar la comercialización de reproductores realmente libres es recomendable la utilización de técnicas con mayor sensibilidad como PCR. Por último, cabe señalar que es necesario realizar nuevos relevamientos epidemiológicos, ya que los más recientes a nivel nacional datan de 1960.

2. SUMMARY

Ovine brucellosis is an infectious disease of bacterial origin, caused by *Brucella Ovis*, which affects mostly the ram. The most important manifestations are epididymitis and a decrease of the spermatic quality, thus causing a slight symptomatology on the sheep. The importance of this disease lies on the reduction of the reproductive rate, the deletion of the rams, as well as on the commercial restrictions. The agent has been identified in all the countries that perform sheep breeding. The first isolation from the same agent was in the 1953 in Australia and New Zealand. In Uruguay, the first diagnosed case was in 1956. In the 1960s it was estimated that in Uruguay the 50% of the establishments and the 10% of the rams had the agent that caused it. The entry of the bacterium to the organism is caused through the mucous membranes, principally on the penis, then it colonizes regional nodes and through the blood it is distributed to the rest of the organism. After two months, the infection is localized only on reproductive organs. Clinically, the 70% of the males affected do not present appreciable signs, acquiring on this way many importance the laboratory diagnosis, which includes seminal and serologic analysis. At national level, the diagnosis method used more frequently is the AGID, but there are other options with more sensitivity like ELISA and PCR. Until now, there is not a specific description of an effective treatment and a vaccine with a recognized efficiency does not exist. As a result, control is crucial to remove the infected animals as well as prevention to avoid the entry of carrier animals.

In the current report of the case, a clinic exploration of five rams was performed on a commercial establishment. Two animals with an asymmetry of the epididymis were discovered. Based on this discovery, it was decided to perform a seminal and serologic evaluation to all the rams to confirm the presence of the *B. ovis*. Some of them presented spermatic alterations and 3 of them were positive in the serologic test. One of them did not present clinical symptoms. A bilateral orchiectomy was performed to 4 rams. In some of them, macroscopic characteristics were noticed from the illness, which were confirmed for pathology and anatomic histopathology. Through a bacteriological culture, *B. ovis* was isolated from the 3 positive cases to AGID and also one of the negatives. It was concluded that diagnosing is not enough; it is necessary to identify the infection by an analysis on the individual carriers at the laboratory. The techniques used at national level is AGID, but to guarantee the commercialization from the reproducer that are agent-free, the employment of techniques with more sensibility like PCR is recommended. Finally, it should be noticed that it is necessary to perform new epidemiological surveys, because the most recent of them at National level was from the 1960.

3. INTRODUCCIÓN

La brucelosis ovina es una enfermedad infectocontagiosa de origen bacteriano, causada por *Brucella ovis* (*B. ovis*), que afecta al tracto reproductivo de ovinos machos y hembras ocasionando como principales alteraciones orquitis, epididimitis, placentitis y aborto (Rizzo y col., 2014), pudiendo manifestarse de forma clínica o subclínica (Oliveira, 2011). Se ha identificado al agente en todos los países que realizan la ovinicultura (Radostits y col., 1999), el primer aislamiento del mismo fue en el año 1953 en Australia y Nueva Zelanda (Mederos, 1995). En nuestro país el primer diagnóstico se realizó en el año 1956. En la década del 60 se estimó que en Uruguay el 50% de los establecimientos y el 10% de los carneros presentaban el agente causal (Bermúdez, 2004). El ingreso de la bacteria al organismo ocurre a través de membranas mucosas (Leal, 2009), principalmente la peneana (Nozaki, 2003), luego coloniza ganglios regionales y a través de la sangre se distribuye al resto del organismo. Dos meses pos infección se encuentra solamente en órganos reproductores (Escalera, 2010). Clínicamente el 70% de los machos afectados no presentan manifestaciones apreciables (Robles, 2004), adquiriendo de esta forma gran importancia el diagnóstico de laboratorio (Piquet, 2004), este incluye análisis seminal y serología. El impacto de la misma es esencialmente económico, ya que no tiene carácter zoonótico. Su presencia en la majada se refleja en la menor tasa de procreo y nacimientos (Mederos, 1995), así como en el aumento de la mortalidad perinatal, descarte anticipado de carneros (Escalera, 2010), aumento de los abortos, restricciones en el comercio, disminución en los ingresos por venta de reproductores, desprestigio de la cabaña, aumento de los costos derivados de honorarios profesionales y pruebas diagnósticas (Robles, 2008).

3.1. Etiología

La *Brucella spp.*, afecta a varias especies animales (Nozaki, 2003), cada una de sus especies mantiene siempre un hospedador principal, siendo la adaptación a los mismos superiores a la que se da en hospedadores secundarios o accidentales. En este sentido vemos que los bovinos son hospedadores naturales para *Brucella abortus* (*B. abortus*), los ovinos y caprinos para *Brucella melitensis* (*B. melitensis*), los suinos para *Brucella suis*, los caninos para *Brucella canis* (*B. canis*), los ovinos para *B. ovis*, para roedores *Brucella neotomae* (Crespo, 1994), pinnípedos para *Brucella pinipedalis* y cetáceos para *Brucella ceti*, topillo de campo y zorro rojo para *Brucella microti* (Leal, 2009), mientras que *Brucella inopinata* ha sido aislada en el humano (Tiller y col., 2010). Cabe destacar que *B. melitensis* y *B. abortus* son las que más se han aislado en casos de brucelosis humana a nivel mundial (Méndez y col., 2015) y que *B. ovis* y *B. canis* son altamente específicas para sus huéspedes habituales (Crespo, 1994), siendo la infección natural por *B. ovis* exclusiva de ovinos (Hernández, 2009).

En la actualidad solo se ha identificado un tipo de *B. ovis* (Nozaki, 2003). El primer aislamiento registrado en Australia y Nueva Zelanda ocurrió en el año 1953 (Mederos, 1995), siendo el primero en Uruguay en 1956 (Bermúdez, 2004). En Argentina se aísla en 1961 (Troncoso y col., 2014), mientras que en

Rio Grande do Sul en el año 1972 (Machado y col., 2015). Esta bacteria está presente en la mayoría de las zonas donde se desarrolla la ovinicultura (Mederos, 1995).

La *B. ovis* está formada por una membrana interna, un espacio periplásmico y una membrana externa integrada por lipopolisacáridos y otras proteínas. Se ha reportado que la *B. ovis* al igual que la *B. canis* son las únicas especies del género *Brucella* patógenas en fase rugosa, esto es debido a que los lipopolisacáridos de la membrana externa compuestos ya sea por los lípidos A o M y un oligosacárido, no contienen la cadena polisacárida O. Esta característica de presentarse en fase rugosa es la que les brinda la propiedad de auto aglutinar en solución salina (Crespo, 1994).

3.2. Epidemiología

La brucelosis ovina se ha descrito en la mayoría de los países productores de ovinos, pudiendo alcanzar su prevalencia hasta un 75% de los carneros (Radostits y col., 1999). En Uruguay se estimó en la década del 60 que el 50% de los establecimientos y el 10% de los carneros presentaban el agente causal (Bermúdez, 2004).

Si bien se ha reproducido de forma experimental la enfermedad en ciervos de cola blanca (Radostits y col., 1999) y caprinos, se desconoce si la misma se puede presentar de forma natural en éstos (Fachini y col., 2016), por tanto, se acepta que la *B. ovis* es exclusiva de los ovinos (Oliveira, 2011).

La *B. ovis* afecta principalmente a ovinos machos sexualmente activos y retarjos. El macho entero es su mayor difusor y perpetuador, tanto dentro de la majada como entre distintas majadas, ya que en condiciones de campo con monta natural una hembra suele ser servida por más de un macho (Leal, 2009). La transmisión entre machos también es común debido a las prácticas homosexuales entre éstos sobre todo cuando son mantenidos apartados de las hembras, ya sea de forma directa por vía rectal o de forma indirecta a través de la mucosa palpebral, ocular o prepucial. El contagio mediante la ingestión de pastos contaminados con fómites, descargas genitales, restos de secundinas y fetos abortados parece poco probable (Nozaki, 2003).

Si bien existen reportes de que esta bacteria afecta raramente a hembras en las cuales se manifiesta con abortos (Oliveira, 2011), siendo éstos de carácter tardío (Piquet, 2004); Paolicchi y col. (2007) sostienen que es muy posible la existencia de hembras persistentemente infectadas, las que cumplirían un rol importante en la perpetuación del agente causal dentro de la majada, aunque no se ha demostrado que las mismas puedan transmitir *B. ovis* al carnero.

Algunos autores coinciden que afecta a todas las razas por igual (Oliveira, 2011); mientras que Nozaki (2003) cita una mayor resistencia de la raza merino respecto a razas británicas y sus cruza.

3.3. Patogenia

La infección, al igual que en el resto de las brucellas, es producida a través de las membranas mucosas (Leal, 2009). En el caso de *B. ovis* la vía venérea se ha identificado como la principal forma de contagio especialmente penéana, rectal o vaginal pudiendo ocurrir también por vía nasal o conjuntival (Nozaki, 2003). Ingresa a través de las mucosas, coloniza los ganglios regionales y por vía hemática se distribuye al resto del organismo llegando a hígado, riñones, bazo, pulmones, demás nódulos linfáticos y aparato reproductivo. Al segundo mes post infección se encuentra solamente en epidídimos, vesículas seminales, glándulas bulbo uretrales, ampolla de los conductos deferentes y a veces en riñón (Escalera, 2010).

En los machos al alcanzar los epidídimos, produce destrucción de los túbulos seminíferos con la consecuente extravasación y acúmulo de espermatozoides en el tejido intersticial. La reacción inflamatoria resulta en un granuloma y posterior atrofia testicular (Oliveira, 2011). La primera anomalía observable entre las 2 a 8 semanas post infección es la presencia de células inflamatorias en el semen, en dicha muestra a las 3 semanas se visualiza *B. ovis* de forma intermitente. Las alteraciones testículo epididimarias se palpan a partir de las 9 semanas. Las lesiones varían según el estado inmunitario del animal (Radostits y col., 1999).

En las hembras vacías *B. ovis* produce vaginitis, cervicitis y endometritis con la consecuente infertilidad temporaria. En las gestantes la bacteria reaparece en el tracto genital hacia la segunda mitad de la gestación, provocando placentitis con muerte fetal y aborto, o nacimiento de crías débiles (Nozaki, 2003).

3.4. Sintomatología

En el carnero la enfermedad se caracteriza inicialmente por una baja calidad seminal, aparición de granulomas espermáticos, seminovesiculitis y fibrosis progresiva del epidídimo, la cual puede ser palpable generalmente de forma unilateral y ocasionalmente bilateral, pudiendo sobrevenir la atrofia testicular (Nozaki, 2003). Se debe tener en cuenta que las alteraciones morfológicas de testículos y epidídimos suelen pasar desapercibidas hasta los estadios más avanzados de la enfermedad, cuando se logran apreciar son indicadores de cronicidad. Se ha visto que hasta un 70% de los machos afectados no desarrollan ninguna lesión palpable resultando ser portadores asintomáticos durante largos períodos de tiempo (Robles, 2004), pero eliminando brucellas en el semen. Esta situación hace que cobre gran importancia el diagnóstico de laboratorio (Piquet, 2004). Las alteraciones morfológicas conllevan a la disminución de la calidad seminal y por ende de la fecundidad, lo cual se traduce en una menor producción de corderos (Mederos, 1995). Como sintomatología general se describe fiebre, inapetencia y disnea (Meglia y col., 2008).

Las ovejas infectadas, con frecuencia suelen ser seronegativas y la presencia de *B. ovis* en una majada puede evidenciarse por la disminución de nacimientos, aumento del intervalo interpartos y disminución de la viabilidad posnatal. Solo un porcentaje menor de hembras desarrolla la infección activa la cual provoca abortos en el último tercio de la gestación. Las alteraciones en

la placenta se caracterizan por placentitis intercotiledoneana crónica y en el feto se puede observar bronconeumonía catarral o fibrino purulenta (Leal, 2009).

Como se ha puesto de manifiesto, la importancia de la presencia de *B. ovis* en la majada, radica en el descenso de productividad de la misma dada por el menor número de corderos obtenidos y por el descarte anticipado de reproductores (Carrera y col., 2010).

3.5. Diagnóstico

3.5.1. Diagnóstico Clínico

El diagnóstico presuntivo de brucelosis ovina en machos enteros se realiza mediante la inspección y palpación tanto de testículos como de epidídimos, teniendo en cuenta que no siempre los mismos desarrollan lesiones palpables.

El examen andrológico es una evaluación de tipo clínica-reproductiva que se realiza con el objetivo de seleccionar e identificar reproductores potencialmente fértiles. Éste se realiza con un mínimo de 60 días de antelación al inicio de la encarnada, ya que este es el lapso estimado para la espermatogénesis. Con el fin de detectar animales afectados y tener tiempo suficiente para tratar dichas afecciones, poder descartar a todos los que presenten problemas irreversibles y prever, si fuera necesario, la compra de reproductores de reemplazo (Manazza, 2004).

La performance reproductiva de las majadas está influenciada por la época de encarnada, el peso vivo y la condición corporal de las hembras al servicio, el nivel nutricional en los momentos claves del ciclo reproductivo y la fertilidad de los carneros. Los altos porcentajes de machos utilizados en nuestro medio, que varía normalmente entre un 3 a 4%, enmascara la presencia de individuos reproductivamente no aptos (Bonino, 2000).

En un primer momento se deben recabar todos los antecedentes disponibles sobre la majada, haciendo hincapié en los aspectos vinculados a la reproducción, como número de corderos nacidos y porcentaje de señalada. También el manejo sanitario, el manejo nutricional y el origen de los carneros. Luego se realiza una observación y evaluación general de los mismos, para lo cual se recomienda previamente apartarlos en la manga, separándolos por edad. En este momento, además de evaluar caracteres productivos de valor económico, se observará presencia de lana en la cara, arrugas en el cuerpo, tamaño de los testículos, estado corporal, aparato locomotor, aplomos y cualquier anomalía apreciable a distancia, para lo cual se observa a los animales en movimiento (Bonino, 2000).

Se recomienda elegir un lugar cómodo para trabajar, tanto para el personal auxiliar, como para el veterinario. Se revisa cabeza, boca, ojos, lomo, pecho, pezuñas, escroto, testículos, epidídimos, prepucio y pene. Se establece una metodología de trabajo para evitar omisiones y para que resulte más eficiente y organizada la tarea (Manazza, 2004). Se procede a sentar al carnero, para

poder revisar de forma detallada las pezuñas y en el mismo momento se observará el pecho (Bonino, 2000). Se continuará con los genitales externos comenzando con prepucio y pene, observándose en el mismo la presencia del apéndice vermiforme. El pene se exterioriza con el carnero sentado, ejerciendo una leve presión en la flexura sigmoidea y deslizando el prepucio hacia caudal (Ramos y Ferrer, 2007). A la inspección del escroto debemos considerar que su piel es fina, presenta glándulas tanto sudoríparas como sebáceas y se encuentra cubierta por pelos o lana. Presenta una depresión entre ambos testículos llamada rafe escrotal que en algunos animales aparece muy marcado. A la palpación se evalúa la elasticidad, el volumen, la temperatura, la sensibilidad y el desplazamiento de los testículos dentro del escroto. Los testículos pesan de 200g a 300g cada uno, tienen forma ovoide y su polo caudal está orientado ventralmente (Ramos y Ferrer, 2007). Se debe verificar la presencia de ambos testículos, ya que la ausencia de éstos en el escroto, es sinónimo de esterilidad; la presencia de uno solo, no siempre afecta la fertilidad, pero al ser una característica heredable, se recomienda eliminar al animal. En cada testículo palpamos comparando con su homólogo la conformación, la simetría y el tamaño, este es importante, pues cada gramo de tejido testicular produce 20 millones de espermatozoides por día. Esta característica es heredable y se refleja en el mayor número de crías obtenidas. La relación entre tamaño y circunferencia escrotal es un parámetro de medición objetivo. Debemos tener en cuenta que esa medida está influenciada por la edad, el peso corporal, la época del año y la raza (Capandeguy y Mattos, 2014).

La palpación del contenido escrotal se realiza con ambas manos en sentido dorso ventral, palpando simultáneamente el cordón espermático, el epidídimo y los testículos. La consistencia de los testículos normales es duro-elástica, pudiendo ser blando-elástica cuando desaparece el epitelio germinal, duro-inelástica cuando hay inflamaciones crónicas, si existen abscesos puede ser flácida o fluctuante (Ramos y Ferrer 2007). El tono testicular está conformado por la firmeza y la elasticidad. La firmeza es la resistencia que ofrece el órgano a la presión y la elasticidad es la capacidad de volver a su estado previo luego de la presión ejercida. Existen diferentes escalas subjetivas para expresar el tono testicular, las más destacables son la de Galloway y la de Rutter y Russo (Cuadro 1).

Cuadro 1: Escala subjetiva de tono testicular (Capandeguy y Mattos, 2014)

ESCALA DE GALLOWAY		ESCALA DE RUTTER Y RUSSO	
1	Fibrosis - elasticidad nula.	1	Muy firme y muy elástico
2, 3 y 4	Tono normal - elasticidad buena.	2	Firme y elástico
5	Flacidez y esponjosidad	3	Moderada firmeza y elasticidad
		4	Blando y esponjoso
		5	Muy blando y muy esponjoso

Conjuntamente con los testículos se procede a evaluar los epidídimos, éstos son los órganos encargados de recoger, transportar, madurar y almacenar los espermatozoides producidos en los testículos. El epidídimo se encuentra adherido al testículo y es de consistencia más firme que éste, a la palpación se diferencian tres partes: cabeza, cuerpo y cola (Bonino, 2000). El epidídimo se localiza en el borde caudomedial del testículo, estando orientados cada uno hacia el homólogo. Además, están firmemente unidos a los polos del testículo correspondiente. La cabeza del epidídimo se continúa hasta cierta distancia sobre el borde libre del testículo antes de continuar a lo largo de él. La cola se proyecta ventralmente formando una marcada elevación, tiene una consistencia generalmente firme y se vuelve más blanda luego de cada eyaculado (Dyce y col., 1998). Tanto la cabeza como la cola del epidídimo se palpan con facilidad. Además de los testículos y epidídimos, se debe palpar el cordón espermático formado por el paquete vascular, el conducto deferente y el músculo cremáster (Ramos y Ferrer, 2007). Finalizada la revisión, los carneros se pueden clasificar en aptos para la reproducción, temporalmente no aptos o definitivamente no aptos (Bonino, 2000).

3.5.2. Diagnóstico de Laboratorio

Como se mencionó anteriormente no todos los carneros portadores de *B. ovis* desarrollan lesiones palpables, por esto es que la eliminación de los mismos no es suficiente para erradicar la enfermedad, sino que es necesario eliminar los excretos subclínicos identificándolos mediante análisis de laboratorio (Piquet, 2004). Los mismos incluyen análisis seminal, cultivo y aislamiento del agente, así como serología.

Con respecto a la evaluación seminal, ninguna prueba por si sola puede predecir con exactitud la fertilidad de una muestra de semen. El examen de diversas características físicas del mismo, puede determinar el mayor potencial de fertilidad (Ax y col., 2007). El semen se encuentra constituido por los espermatozoides por un lado y por el plasma seminal resultante de la secreción de las glándulas anexas y epidídimos por otro. Comúnmente la relación plasma – espermatozoides que constituyen el semen del carnero es de 75% a 25% respectivamente, alcanzando el primero, valores de hasta el 95% al obtenerse por electroeyaculación. Si se somete la muestra al centrifugado a 800 r.p.m. luego de 15 minutos se logra separar completamente ambos componentes del semen (Ramos y Ferrer, 2007). El color normal del semen es blanco cremoso dependiendo de la concentración de espermatozoides, aclarándose y volviéndose más traslucido a medida que la concentración espermática disminuye (Fernández, 2006). El color acuoso es indicio de baja o nula fertilidad, el color rosado indica presencia de sangre, el gris turbio evidencia procesos inflamatorios en el tracto reproductor. El olor está dado por contaminación con orina o infección bacteriana, por lo tanto, es indicio de una muestra de mala calidad (Ramos y Ferrer, 2007). El volumen varía de 0,5 a 2 mililitros en animales adultos, mientras que en jóvenes varía de 0,5 a 0,7 mililitros (Ax y col., 2007). El mismo puede variar en función de la excitación previa a la que fue sometido el macho, el estado sanitario y nutricional, así como la época del año, la edad, el número de eyaculados extraídos previamente en el día y variaciones individuales (Fernández, 2006). El pH

normal varía entre 6,2 y 7,3 (Ramos y Ferrer, 2007). La concentración varía normalmente entre los 3 y 7 mil millones de espermatozoides por mililitro de eyaculado (Ramos y Ferrer, 2007). La misma se determina usando un hematocitómetro, un colorímetro o un espectrofotómetro. El hematocitómetro, es un portaobjetos de microscopio que cuenta con cámaras numeradas con precisión. La cantidad de espermatozoides por cámara se cuentan manualmente, lo cual pese a tomar mucho tiempo, es muy exacta (Ax y col., 2007). La concentración de espermatozoides también se puede estimar subjetivamente mediante una escala de puntuación de la consistencia del semen (Cuadro 2).

Cuadro 2: Concentración del semen del carnero valorada mediante la consistencia (Ax y col., 2007)

PUNTUACIÓN	CONSISTENCIA	NUMERO DE ESPERMATOZOIDES x10 ⁹
5	Cremosa espesa	4.5 - 6.0
4	Cremosa	3.5 - 4.5
3	Cremosa diluida	2.5 - 3.5
2	Lechosa	1.0 - 2.5
1	Brumosa	0.3 - 1.0
0	Transparente/acuosa	Insignificante

La motilidad espermática implica la estimación subjetiva de la viabilidad de los espermatozoides (Ax y col., 2007). La motilidad de masa, se observa a simple vista y a plena luz en un recipiente transparente, se aprecian ondas que son el resultado del movimiento de los espermatozoides vivos y su concentración. Agüero (2012) cita la siguiente escala para clasificar el grado del movimiento en masa:

++++: Actividad cinética muy buena, remolinos intensos con ondas espermáticas apreciables.

+++: Actividad cinética buena, remolinos apreciables, aunque menos intensos.

++: Actividad cinética regular, pocos remolinos y con menor frecuencia que la anterior.

+: Actividad cinética deficiente, el semen forma remolinos solo eventualmente y sin ninguna intensidad.

-: Actividad cinética ausente.

Según Fernández (2006) la motilidad individual hace referencia al desplazamiento del espermatozoide que pueden clasificarse en:

1) Progresivo y rectilíneo, cuando el espermatozoide se proyecta hacia adelante. Siendo importante la existencia del mayor número posible de células con dicho movimiento, ya que este es fundamental para que exista un correcto avance con una velocidad de 3 a 8 milímetros por hora.

2) De retroceso y zigzagueante, el avance sigue un recorrido vacilante y con frecuentes curvas, pudiendo en algunas ocasiones desplazarse hacia atrás debido a alteraciones en la cola.

3) Oscilatorio. Este tipo de movimiento, por lo general anteceden a la inmovilización completa, en el mismo se visualizan los espermatozoides realizando movimientos de lado a lado, pero con un avance muy reducido.

4) Vibratorio, el espermatozoide se desplaza en círculos con mínimos movimientos.

Para esto se utiliza el microscopio óptico con contraste de fase y platina caliente con aumentos de 200 a 400x. Las muestras de semen pueden ser puras o diluidas, si bien la muestra de semen puro nos sirve para observar a los espermatozoides en su ambiente natural, la concentración espermática elevada, puede dificultar la tarea, lo cual se soluciona con la dilución de una pequeña parte de la muestra (Fernández, 2006). Mediante la visualización de la motilidad espermática se puede determinar una puntuación para el vigor de la misma (Cuadro 3).

Cuadro 3: Determinación de la puntuación del movimiento ondulado de los espermatozoides (Ax y col., 2007).

PUNTUACIÓN	ASPECTOS DEL MOVIMIENTO
0	Inmovilidad total
1	Movimiento individual
2	Movimiento muy lento
3	Movimiento ondulado general; amplitud lenta
4	Movimiento rápido, sin remolinos
5	Movimiento rápido, con remolinos

En cuanto a la morfología espermática, existe una correlación positiva entre los espermatozoides con morfología normal y motilidad espermática, aunque todos los eyaculados contiene espermatozoides anormales se debe cuestionar la fertilidad cuando estos ascienden al 20% de las células. El estrés por calor daña grandes cantidades de espermatozoides, las altas temperaturas, junto con altos índices de humedad, pueden volver al macho estéril hasta por 6 semanas, por lo tanto debe proporcionarse al macho una sombra adecuada, agua fresca y limpia. Al igual que el volumen, el número de espermatozoides anormales, varía con las estaciones del año, siendo en primavera más elevada que en la estación reproductiva. La morfología espermática se estudia analizando al menos 150 espermatozoides teñidos mediante las técnicas de eosina-nigrosina, Williams o Wright, debiendo observarse con aumentos de 400x (Ax. y col., 2007). Según Fernández (2006) se pueden utilizar las tinciones de eosina-nigrosina o tinta china, para lo cual se diluye el semen con suero fisiológico a razón de 4 gotas de suero por cada gota de semen y se agrega una quinta gota de colorante. Se debe mezclar la muestra durante 5 a 10 segundos y luego se espera de 40 a 50 segundos, para que el colorante reaccione. Para esto se trabaja en una estufa o sobre placa caliente a 30°C. Luego de realizado el frotis se deja secar y se observa al microscopio sin cubre objeto. Ax. y col., (2007) clasifican las anomalías en sin cola, cabezas anormales, formación anormal de la cola con inclusión citoplasmática proximal y formación anormal de la cola con inclusión citoplasmática distal. En cuanto a las cabezas se pueden clasificar en cabezas normales, ahusadas, microcefalia,

macrocefalia, amorfa, cabezas dobles, sin cabeza, decapitado. Con respecto a la cola, se pueden identificar entre otras colas dobles, colas anudadas, muñones caudales, y colas enrolladas. En la pieza intermedia podemos encontrar, pseudoinclusiones y defectos en sacacorchos.

En cuanto a la calidad seminal del carnero, se entiende que aquellas muestras con anomalías espermáticas menores al 10% se consideran de alta calidad. Pero debe tenerse en cuenta que el número total de espermatozoides vivos es más importante que el número de espermatozoides anormales (Ax. y col., 2007).

Como pruebas confirmatorias se utilizan métodos directos como indirectos. Los primeros son cultivo, aislamiento, coloración y PCR a partir de semen. Los segundos, los cuales se utilizan como diagnóstico de rutina, son estudios serológicos de muestras de suero (Piquet, 2004).

Métodos directos:

Puede aislarse *B. ovis* de placenta, pulmones y contenido estomacal del cordero abortado. En los carneros luego de la castración, se puede aislar de órganos genitales, especialmente epidídimo (Radostits, 1999). Las brucellas crecen en agar sangre al 5-10%. Es esperable que las muestras obtenidas contengan bacterias y hongos contaminantes, por lo que se requiere la utilización de medios selectivos. Estos medios contienen una base nutritiva de agar sangre, suero equino o bovino seronegativo estéril y antibióticos. El medio selectivo más utilizado es el medio Farrelis, que se prepara con la adición de 6 antibióticos a un medio base. El suplemento de antibiótico utilizado en medios selectivos para *B. ovis* generalmente difiere del de *B. abortus*. Las placas inoculadas se incuban a 37°C bajo 5-10% de CO₂ hasta por 15 días. Las cepas de *B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis* y *B. neotomae* suelen estar en forma lisa cuando se aíslan por primera vez. Con los sucesivos pasajes de estas cepas, comienzan a presentarse colonias de morfología rugosa. *B. ovis* y *B. canis* siempre se presentan en forma rugosa, las mismas son opacas, amarillentas y friables. El género *Brucellae* no es hemolítico en agar sangre. Los frotis teñidos con la técnica de Ziehl Neelsen modificado de colonias sospechosas serán positivos si se aprecian cocobacilos pequeños teñidos de rojo. Para la identificación de rutina de *Brucella*, junto con la morfología de la colonia y propiedades de tinción, se realizan pruebas bioquímicas. Las brucellas no son móviles, son catalasa y oxidasa positivas, con excepción de *B. ovis* y *B. neotomae*, dan actividad rápida de ureasa, excepto *B. ovis* y alguna cepa de *B. melitensis*, reducen el nitrato y son indol negativo (Markey y col., 2013).

El método directo PCR ha sido utilizado para la detección de especies de *Brucella* en ensayos que se han publicado desde finales de 1980. Se aplicó en sangre, leche, tejidos y semen, con ensayos específicos para loci genéticos únicos altamente conservados para el género *Brucella*. Aunque pueden surgir problemas tales como la co-purificación de los inhibidores de la PCR con ADN del organismo, la sensibilidad puede ser mejor que la lograda mediante cultivo una vez que se resuelven esos problemas. Las pruebas moleculares para distinguir entre las especies de *Brucella* y/o biovares deben apuntar a loci que

son variables entre especies, estos son poco comunes en brucellas, ya que el género es extremadamente homogéneo, pero se han desarrollado varios ensayos capaces de discriminar entre especies (Markey y col., 2013).

Métodos indirectos:

Las pruebas serológicas son los métodos más utilizados y según Tizard (2009) se juzgan por el número de resultados falsos positivos que originan (especificidad) y por el número de falsos negativos (sensibilidad). Las pruebas más empleadas son IDGA, LISA y FC. La prueba que tiene más posibilidades de ser utilizada para el diagnóstico en laboratorios no especializados, es la IDGA debido a su simplicidad y facilidad de interpretación. La FC tiene la desventaja de ser compleja y difícil de implementar con muestras hemolizadas. ELISA sola o combinada con IDGA es una prueba de muy buena sensibilidad y puede ser utilizada por laboratorios de mediana complejidad (Baigún y col., 2000). ELISA presenta una sensibilidad del 93% y una especificidad del 97,5%, mientras que IDGA presenta una sensibilidad del 90% y una especificidad del 95% (Mederos, 1995). Las pruebas serológicas más sensibles y específicas detectan directamente el antígeno o el anticuerpo de interés, éstas se denominan pruebas de unión primaria. Las pruebas de unión secundarias son más sencillas de realizar, pero son menos sensibles (Tizard, 2009).

Las pruebas de unión primaria se realizan permitiendo la unión del antígeno con el anticuerpo, para luego medir los inmunocomplejos formados. Es necesario tener uno de los reactivos marcado químicamente. ELISA es una de las pruebas de unión primaria más importante de inmunoanálisis en veterinaria, se puede utilizar tanto para detectar anticuerpos como antígenos. Esta técnica se lleva a cabo llenando los pocillos de las microplacas con el antígeno para que se una al poliestireno de la pared, luego se realiza un lavado para eliminar los antígenos no unidos, quedando así los pocillos recubiertos con una capa de antígeno. Luego se agrega el suero que se desea analizar. En caso de presentar anticuerpos específicos para el antígeno, al incubar y lavar se mantendrán unidos. Para confirmar la unión, lo que se realiza es la adición de una solución que contiene una antiglobulina, que al ser incubada, se unirá al anticuerpo del suero. Esta antiglobulina se encuentra ligada químicamente a una enzima. Luego del lavado se coloca el sustrato para la enzima, al entrar en contacto la enzima con el sustrato se obtiene un producto coloreado. Por lo tanto, cuanto más color se produce en el pocillo, más anticuerpos habrá en el suero analizado. Otra opción es utilizar la técnica de antígeno marcado en la cual este antígeno cumple la misma función que la antiglobulina (Tizard, 2009).

Las pruebas de unión secundaria identifican la reacción que normalmente se continúa a la unión del antígeno con el anticuerpo, como por ejemplo la precipitación de los inmunocomplejos que se producen en algunos casos, al unirse antígenos solubles con anticuerpos. En otros casos, la unión puede llevar a la formación de grumos. Si un anticuerpo unido a un antígeno puede activar la vía clásica del complemento y el antígeno está sobre una superficie celular, puede llevar a la lisis de esa célula. Estas reacciones pueden utilizarse para muchos análisis serológicos. Dentro de las pruebas de unión secundaria encontramos: IDGA y FC. La primera se realiza sobre una capa de agar, donde

se perforan pocillos de unos 5 milímetros de diámetro a un centímetro de distancia entre ellos. En uno de los pocillos se coloca el antígeno soluble, en el otro se coloca un antisuero. Ambos reactivos van a difundir de forma radial y en el lugar donde se encuentren en concentraciones óptimas se formará una línea blanca opaca de precipitado. En caso de que en las soluciones utilizadas existan distintos antígenos y distintos anticuerpos, es improbable que los componentes alcancen proporciones óptimas en la misma posición exactamente, por lo tanto, para cada grupo de antígenos y anticuerpos que se unan, se formará una línea de precipitado. En caso de colocar antígeno en dos pocillos y anticuerpo en uno, encontrándose los tres pocillos a la misma distancia, se formarán líneas entre cada pocillo de antígeno y el que contiene los anticuerpos, si las líneas se encuentran unidas, significa que los dos antígenos son idénticos. Si las líneas se cruzan, los antígenos son completamente distintos, si las líneas se unen formando un ramal, significa que existe identidad parcial, uno de los antígenos presenta epitopos que el otro no. Para la FC se parte de la premisa que el complemento se encuentra en todos los sueros frescos. La activación de la vía clásica del mismo por un anticuerpo unido a un antígeno provoca que se generen complejos de ataque a membranas celulares, en el caso de ser un eritrocito ocurrirá hemólisis. Esta prueba mide los niveles séricos de anticuerpos. Para esto lo primero que se realiza es la inactivación del complemento del suero a analizar, para lo cual se lo calienta a 56 °C. Luego ese suero se mezcla con antígenos específicos contra los anticuerpos que se están buscando y se coloca una fuente de complemento para lo cual se puede utilizar suero normal de cobaya. Luego de incubar esa mezcla de antígeno-anticuerpo-complemento hay que ver si aún existe complemento libre, para lo cual se agregan eritrocitos de oveja recubierto de anticuerpos. Si se produce hemólisis vamos a observar un color rojo transparente, lo cual nos va a indicar que aún hay complemento en la mezcla original, por lo tanto es una muestra negativa. Si no se produce hemólisis, se observa como una suspensión turbia de eritrocitos y nos va a estar indicando que la mezcla ya no tiene complemento, o sea que se activó y se consumió al incubar, por lo tanto el suero presenta anticuerpos y es una muestra positiva. Normalmente se titula el suero que se está analizando y en caso de ser positivo, al estar diluido se observara en cada tubo si se produjo hemólisis. El título es la dilución más alta de suero en el cual se lisan más del 50% de los eritrocitos (Tizard, 2009).

3.5.3. Diagnóstico Anatomopatológico e Histopatológico

Durante la etapa aguda de la enfermedad se observa en la fascia escrotal edema inflamatorio, exudado de la túnica vaginal y formación de tejido granuloso. Se aprecian, además, induraciones circunscriptas en el epidídimo y pueden encontrarse granulaciones en el testículo, las cuales en etapas avanzadas sufren necrosis caseosa (Radostits, 1999). Según Ladds (1991) a nivel macroscópico es destacable la irregularidad de tamaño y forma del epidídimo afectado, especialmente en los casos unilaterales. Para esta desproporción contribuye la atrofia testicular concurrente. Pueden existir adherencias fibrosas o fibrinosas entre el órgano afectado y las túnicas adyacentes. La consistencia de dicho epidídimo varía en función de la duración del proceso inflamatorio, así como del desarrollo del granuloma espermático.

En los cuadros crónicos, el marcado incremento del tejido fibroso en el epidídimo y entre éste y las túnicas, resulta en atrofia de los elementos epiteliales y de este modo el epidídimo se torna duro y nodular.

Histológicamente en los conductos epididimarios afectados se observan epitelios lesionados. Estos conductos contienen fibrina, neutrófilos, macrófagos, células gigantes multinucleadas, muchas de las cuales contienen espermatozoides. También se pueden observar espermatozoides en diversos estadios de degeneración, así como acúmulo intersticial de células mononucleares. Se ha observado hiperplasia epitelial, con desarrollo de espacios intraepiteliales. En epididimitis crónicas también puede desarrollarse en los conductos afectados metaplasia escamosa de los epitelios, asociada con fibrosis progresiva y puede haber hipertrofia del músculo liso de los conductos. Se estima que aproximadamente el 90% de los epidídimos afectados por *B. ovis* presentan lesiones a nivel de la cola del mismo. Inicialmente la bacteria produce edema e infiltración macrofágica y linfocítica. Más tarde se suman neutrófilos, cuando los espermatozoides penetran en el intersticio. Las lesiones epiteliales iniciales incluyen hiperplasia y degeneración hidrópica, con formación de espacios intra epiteliales, al tiempo que hay fibrosis creciente de las áreas intersticiales. La fibrosis e hiperplasia derivan en obstrucción de la luz originando éstasis espermático. En los animales afectados las lesiones evolucionan durante varios meses y éstos excretan numerosos microorganismos en el eyaculado. Los eventos subsiguientes dependerán de la extravasación de espermatozoides y la consecuente formación del granuloma espermático. En estos casos la cola del epidídimo puede estar agrandada 4 a 5 veces su tamaño. Si el esperma extravasado penetra en la cavidad de la túnica vaginal, se forman adherencias y aumenta la degeneración testicular. A diferencia de la brucelosis bovina, no hay orquitis primaria. Similares a las lesiones del epidídimo son las del conducto deferente, pero en este caso no se asocian con éstasis espermática ni fugas, existiendo también hiperplasia epitelial pronunciada, con espesamiento y plegamiento de la pared, la lámina propia del epitelio esta densamente infiltrada por linfocitos, células plasmáticas e histiocitos (Radostits, 1999).

El aborto se caracteriza por engrosamiento y edema, restringiéndose a veces a una parte de la placenta, placas firmes elevadas de color amarillento en los espacios intercotiledoneanos con anormalidades variables de los cotiledones, que en la etapa aguda son mucho más grandes y firmes de color blanco amarillento, así como vasculitis ocasional (Radostits, 1999).

3.5.4. Diagnóstico Diferencial

En el macho se hace imprescindible la realización de diagnóstico diferencial de orquitis/epididimitis causadas por *Actinobacillus seminis*, *Histophilus ovis* (Rizzo y col., 2014).

Otras patologías de origen no infeccioso que merecen atención en el caso de aumento del volumen escrotal, que pueden ser diagnosticadas por la palpación del tracto reproductivo son: hidrocele, hematocele, varicocele, espermatocele, neoplasias, hernias inguinales y criptorquidismo (Rizzo y col., 2014).

- *Actinobacillus seminis*

Causa epididimitis en los carneros, pero también ha sido aislado de las articulaciones de corderos con poliartritis purulenta, septicemia y sinovitis. La infección suele darse en animales vírgenes, detectándose entre los 4 y 18 meses de edad, pero también se presenta en los adultos. Si bien la fertilidad disminuye, el principal impacto económico deriva de las pérdidas de ventas de animales de alto valor genético y de la necesidad de diferenciar esta enfermedad de la Brucelosis (Radostits, 1999). Puede haber peri orquitis severa y difusa, generando en algunos casos un absceso en uno o ambos epidídimos, que fistuliza a través de la pared escrotal. Histológicamente, la lesión inicial en el epidídimo es similar a la producida por *B. ovis*, que se caracteriza por espacios intra epiteliales. En la forma crónica de la enfermedad, en carneros más viejos, el o los epidídimos afectados se encuentran agrandados y fibróticos y los testículos atrofiados. Las vesículas seminales o la próstata pueden estar afectadas. La inoculación experimental de carneros con la bacteria por diversas vías, ha demostrado que el tracto genital puede infectarse total o parcialmente, pero que el epidídimo es el órgano más afectado (Ladds, 1991).

- *Histophilus ovis*

La clasificación de esta bacteria aun es motivo de discusión, podría tratarse de el mismo género y la misma especie que *Histophilus agni* y *Histophilus somnus*. Se han aislado los agentes antes mencionados de ovejas que padecían una gran variedad de procesos piógenos, incluyendo septicemia, poliartritis en animales jóvenes, meningitis, meningoencefalitis trombotica, piemia generalizada, metritis, abortos, mortalidad neonatal y epididimitis en carneros. Las lesiones epididimarias ocasionadas por *Histophilus ovis* son similares y probablemente este microorganismo es una variante bioquímica de *Actinobacillus seminis*. La enfermedad se presenta esporádicamente y la lesión más frecuente consiste en un gran absceso multilobulado que afecta un epidídimo. El absceso contiene mucho fluido y pus amarillo-verdoso con acúmulo de material necrótico. También se producen adherencias fibróticas en las tunicas. En casos agudos, con abscedación epididimaria, el conducto deferente suele contener pus y fluido espermático, en los casos crónicos, sin abscesos focales, la porción del epidídimo adyacente al conducto deferente suele estar vacía y la fibrosis de sus paredes suele ser apreciable macroscópicamente. Microscópicamente la respuesta inicial es muy supurativa, involucrando a las paredes de los túbulos epididimarios, luego la infección puede extenderse al estroma, llevando en los casos crónicos a epididimitis intersticial extensa con fibrosis abundante. Al igual que en la brucelosis, el testículo es afectado en forma secundaria. En estos casos de epididimitis también se han aislado *Actinobacillus seminis* y *Staphylococcus aureus* de las lesiones (Radostits, 1999).

- *Corynebacterium Pseudotuberculosis Ovis*

Dentro de los datos clínicos que presenta la linfadenitis caseosa se describen, en carneros lesiones intra escrotales, pero sin verse afectados los testículos ni la calidad seminal. También se observa un aumento de tamaño de los ganglios

linfáticos superficiales debido a la abscedación, mayormente los submandibulares, pre escapulares, pre crurales, supra mamario y poplíteo, así como también la piel. Estos abscesos se suelen romper drenando pus caseoso o cremoso. En los animales con enfermedad sistémica puede presentarse neumonía crónica, pielonefritis, ataxia y paraplejia, describiéndose más a menudo un cuadro debilitante asociado a la formación de abscesos internos. Las fuentes de infección son los abscesos rotos de los ganglios linfáticos superficiales, así como las secreciones nasales y bucales de los animales con abscesos pulmonares. El microorganismo puede sobrevivir en el suelo hasta 8 meses, en lugares protegidos de la luz hasta 4 meses, en heno hasta 2 meses y en baños de inmersión por 24 horas como mínimo. Las temperaturas bajas y la humedad pueden prolongar la supervivencia del agente en los lugares antes mencionados. La transmisión de la enfermedad se da por contacto con secreciones de animales infectados, estando la misma facilitada por las abrasiones de la piel siendo la esquila un momento especialmente importante (Radostits, 1999).

- Hidrocele

Es la acumulación de fluido seroso en el escroto, en la cavidad vaginal o en el cordón espermático. Si bien sus causas no se han determinado, algunos autores lo asocian a la monta excesiva, traumas, procesos inflamatorios previos, estasis venoso o linfático (Ramos y Ferrer, 2007).

- Hematocele

Es un acumulo de sangre que puede darse tanto en la cavidad vaginal como en el resto de las envolturas testiculares. Como consecuencia de la presión que genera el líquido acumulado, tanto el hidrocele como el hematocele suelen derivar en atrofia testicular (Ramos y Ferrer, 2007).

- Varicocele

Es la alteración producida por la presencia de venas espermáticas tortuosas y dilatadas en exceso. Esta patología parece tener un componente hereditario importante, por tanto se recomienda el descarte del reproductor (Ramos y Ferrer, 2007).

- Hernias

Esta patología si bien no es una alteración testicular propiamente dicha, la presencia de peritoneo y/o asas intestinales en el escroto tiene graves consecuencias sobre la vascularización y termorregulación testicular, afectando así la espermatogénesis (Ramos y Ferrer, 2007).

- Espermatocel

Se produce cuando los espermatozoides toman contacto con el tejido conectivo, produciéndose así una reacción inflamatoria típica. En el origen del granuloma espermático se distinguen dos etiologías, la congénita relacionada a la presencia de conductos deferentes ciegos, que afecta mayoritariamente la cabeza del epidídimo y por otro lado la infecciosa, en este caso la localización

mayoritaria se da a nivel de la cola del epidídimo y tienen como característica generar adherencias importantes con la túnica vaginal parietal. El granuloma congénito tiene como característica clínica la asimetría a nivel de las cabezas, pudiendo generar edema y proliferación conectiva del cuerpo y la cola. En sus comienzos la cola se palpa vacía por la espermiostasis existente en la cabeza, a medida que el cuadro evoluciona y se cronifica el epidídimo se palpa como

un duro cordón de 3 centímetros de diámetro. El bloqueo del epidídimo y laconsecuente espermiostasis conducen a la atrofia testicular. El contenido del granuloma puede ser de consistencia caseosa, fluido y de color amarillento, indistinguible macroscópicamente del pus (Castrillejo, 1987).

En las hembras se deben considerar aquellas patologías que provoquen aborto o metritis (Cuadro 4).

Cuadro 4: Principales agentes infecciosos causantes de aborto ovino (modificado de Radostits, 1999).

AGENTE CAUSAL	TRANSMICIÓN	MOMENTO DEL ABORTO	DATOS CLINICOS	ALTERACIONES ANATÓMICAS Y UBICACIÓN DEL AGENTE CAUSAL
<i>Brucella ovís</i>	Venérea pasiva	Tardíos, muertos al nacer, corderos débiles.	Epididimitis en carneros, abortos en ovejas.	Bacterias en estomago fetal y placenta.
<i>Campylobacter fetus / jejuni</i>	Ingestión	Últimas seis semanas de gestación, corderos débiles.	Aborto y metritis.	Agente causal en estomago fetal, hígado con focos necróticos.
<i>Chlamydia psittaci</i>	ingestión	Últimas dos semanas de gestación, corderos débiles.	Mortalidad perinatal, ovejas sin sintomatología.	Agente causal en cotiledones fetales, degeneración placentaria.
<i>Toxoplasma gondii</i>	Ingestión	Tardíos, corderos débiles.	Abortos, mortalidad perinatal, ovejas sin sintomatología.	Agentes causales en tejido trofoblastico, focos necróticos en cotiledones fetales.

4. TRATAMIENTO Y CONTROL

Hasta el día de hoy no se ha descrito un tratamiento eficaz para la brucelosis ovina, por lo que toma un papel fundamental el control y prevención de la misma, mediante la revisión clínica y muestreo serológico de los machos de forma periódica y sistemática con la consiguiente eliminación de los individuos identificados como positivos. Así mismo se recomienda mantener los machos jóvenes en un lugar separado de los adultos (Oliveira, 2011).

A diferencia de otras brucellas, en el caso de la *B. ovis* no existe una vacuna específica de eficacia reconocida a nivel internacional. Sin embargo la vacuna REV-1 desarrollada para el control de *B. melitensis* es también efectiva para el control de *B. ovis* en carneros y retarjos (Robles, 2004).

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general:

Realizar el diagnóstico de *B. ovis* en un establecimiento comercial con diagnóstico presuntivo de dicha enfermedad en un carnero.

5.2. Objetivos específicos:

1. Realizar el diagnóstico presuntivo de la enfermedad mediante el examen clínico de los carneros.
2. Realizar el diagnóstico definitivo de la enfermedad mediante serología.
3. Relacionar el diagnóstico de la enfermedad con la evaluación seminal de los animales afectados.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

En el mes de julio de 2017 se concurrió a un establecimiento, ubicado en el departamento de Florida, Uruguay, para la evaluación reproductiva post-encarnerada de cinco carneros (Cuadro 5).

Cuadro 5: Identificación de los animales y edad.

NÚMERO DE CARAVANA	EDAD (DENTICIÓN)
2022	Boca llena
2363	Cuatro dientes
2364	Cuatro dientes
2365	Cuatro dientes
2424	Diente de leche

En dicho establecimiento se realiza ciclo completo tanto de bovinos, de raza Hereford, como de ovinos, donde se realiza el cruzamiento de la raza Corriedale con Texel. La encarnerada se realiza durante 45 días, desde el 1 de marzo al 14 de abril, mediante monta natural a campo. La estructura de la majada de cría y el porcentaje de señalada de los últimos tres años, se presenta en el cuadro 6. La majada se mantiene todo el año sobre campo natural. El manejo sanitario consiste en un esquema de dosificaciones antiparasitarias estratégicas y tácticas, basadas en extracción de materia fecal para realizar examen coprológico en laboratorio. También se realiza vacunación anual de todos los corderos contra ectima contagioso, así como vacunaciones contra clostridios pre-parto y a los corderos a partir de los dos meses de vida.



Figura 1: Carneros evaluados.

Cuadro 6: Estructura de las categorías reproductivas y porcentaje de señalada en los años 2016, 2017 y 2018.

AÑO	CARNEROS	OVEJAS	PORCENTAJE DE SEÑALADA (%)
2016	4	150	76
2017	4	220	67
2018	4	120	85

El productor manifestó que uno de sus carneros, con la caravana de identificación interna N° 2022, se encontraba deprimido. Al realizar el examen clínico, se observó una deformación importante a nivel escrotal. A la inspección se evidenció eritema de la región afectada, una clara asimetría testículo-epididimaria, con aumento del lado izquierdo. A la palpación se encontró calor,

dolor y tumefacción, no pudiéndose diferenciar el testículo de la cola del epidídimo. Frente a las manifestaciones clínicas observadas en la revisión se plantean dos posibles diferenciales, uno de origen traumático y otro infeccioso, que podría deberse a *B. ovis*.

Debido a la presencia de alteraciones a nivel epididimario en dos carneros, se descartó el origen traumático y se sospechó de una epididimitis causada por *B. ovis*. Para el diagnóstico se decidió proceder a la extracción de sangre de la vena yugular de todos los animales, con el fin de realizar serología para *B. ovis*.

Previo a la extracción, se realizó la antisepsia de la zona con alcohol etílico al 70%. Para la misma, se utilizaron jeringas descartables de 5 mililitros con agujas calibre 18G. Las muestras fueron remitidas al Laboratorio Oficial Miguel C. Rubino, en tubos secos correctamente identificados, para realizar la técnica de Inmunodifusión en gel de agar.

Posteriormente se procedió a la extracción seminal, junto al Departamento de Reproducción de Facultad de Veterinaria (UdelaR). Se utilizó la técnica de electroeyaculación en todos los carneros, a excepción del animal N° 2424, al cual se le realizó la orquiectomía a pedido del productor, ya que no lo quería como reproductor. El equipo utilizado fue un electroeyaculador Electrojack, USA. Para la extracción se colocó al animal en decúbito lateral, se introdujo el vástago de 30 centímetros de largo por 1,5 centímetros de diámetro con 3 electrodos lineales de 1 centímetro de ancho, previa lubricación del mismo con carboximetilcelulosa. Una vez exteriorizado el pene, se lo mantuvo fuera del prepucio mediante una gasa estéril y el proceso uretral fue colocado dentro de la copa de colección. La estimulación eléctrica



Figura 2: Extracción de la muestra seminal.

consistió en 10 pulsos de 3 a 5 segundos de duración para cada voltaje, comenzando en 1 voltio y aumentando en forma creciente hasta un máximo de 4 voltios.

Las muestras fueron recogidas en copa, inmediatamente se realizó la evaluación macroscópica del volumen, color, densidad y motilidad en masa. Posteriormente se mezclaron 2 gotas de semen con 2 mililitros de formol salino bufferado en un tubo limpio, los cuales fueron mantenidos a temperatura ambiente para la posterior evaluación morfológica de los espermatozoides.

Se decidió realizar la orquiectomía bilateral de todos los carneros positivos a IDGA y del animal N° 2424, para lo cual se optó por la técnica a vaginal abierta. Previo a la cirugía se realizó la sedación intravenosa con una combinación de acepromacina al 1% (a la dosis de 0,05 mg/kg) y ketamina al 5% (a la dosis de 0,2 mg/kg). La terapia antibiótica se realizó por la vía intramuscular profunda con bencilpenicilina procaínica y sulfato de dihidroestreptomocina 200.000 U.I. y 250 mg/ml respectivamente (a razón de 20.000 UI/kg) cada 24 horas durante

3 días y como analgésico se utilizó flunixin de meglumine a la dosis de 1,5 mg/kg. Una vez sedado, el paciente fue posicionado en decúbito lateral, para lavar y depilar la región del escroto. Se procedió a la anestesia local utilizando lidocaína al 2% (teniendo en cuenta que la dosis tóxica en rumiantes es de 10 mg/kg). Se efectuó el bloqueo anestésico de la línea de incisión del escroto y del paquete vasculo-nervioso a nivel del cuello escrotal. Se realizó la antisepsia de la zona con yodopovidona al 1% y se colocaron campos quirúrgicos alrededor del escroto. Se abordó el mismo a nivel de la zona ventral, a través de la incisión de la piel y de la túnica vaginal, se exteriorizó el testículo. Se procedió a separar el músculo cremáster desde el cordón testicular. Se colocó una ligadura de transfixión en el cordón testicular formado por la arteria testicular, venas testiculares, vasos linfáticos que corren junto con las venas, nervios del plexo testicular, deferente con arteria y vena deferente, musculo liso, capa visceral de la túnica vaginal, para lo cual se utilizó hilo reabsorbible confeccionado en base a ácido poliglicólico número cero. Luego se procedió a la colocación del emasculador hacia distal de la ligadura, logrando la incisión y la hemostasia, la cual se obtiene luego de un minuto de compresión en la zona. Las incisiones de piel se dejaron cicatrizar por segunda intención.

Mientras se le realizaba la cirugía al carnero N° 2022, al intentar exteriorizar el testículo izquierdo, se encontraron importantes adherencias entre la túnica vaginal y la albugínea del testículo, lo cual imposibilitaba continuar con el procedimiento mediante la técnica de vaginal abierta. Se decidió continuar el procedimiento mediante la técnica a vaginal cerrada (Figura 3).

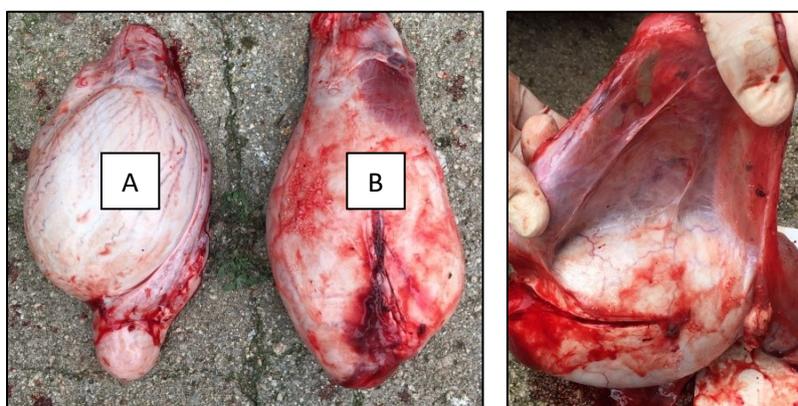


Figura 3: Carnero N° 2022. Testículos sin (A) y con (B) presencia de la túnica vaginal (izquierda). Adherencias entre la túnica vaginal y la albugínea del testículo (derecha).

Se procedió a realizar un punto de transfixión con hilo reabsorbible en el paquete, con el fin de asegurar la hemostasia. Se colocó una pinza hemostática comprimiendo todo el cordón testicular y otra pinza a 3 centímetros hacia distal. Se comenzó a ejercer un movimiento rotacional longitudinal con la segunda pinza, manteniendo la primera inmóvil (técnica de forcipresión-torsión). Se continuó con este movimiento hasta lograr la completa sección de las estructuras involucradas. Al igual que en la técnica anterior las incisiones se dejaron cicatrizar por segunda intención. En todos los casos,

luego de finalizada la intervención se procedió a higienizar la zona con agua y se colocó solución de yodopovidona. Por último, se aplicó a nivel tópico, en la periferia de la herida, un aerosol repelente de moscas y bactericida (composición cada 100 gramos: Sulfadiazina de Plata 0,1 gramos; Aluminio 5,0 gramos; DDVP 1,6 gramos; Cipermetrina 0,4 gramos y excipientes c.s.). Posteriormente los animales fueron llevados a un potrero cercano, para poder mantenerlos bajo vigilancia y poder repetir la medicación post-operatoria indicada.

Los testículos extraídos fueron remitidos al Laboratorio Miguel C. Rubino (Di.La.Ve.), uno de los testículos de cada carnero, se remitió refrigerado para realizar cultivo bacteriológico, mientras que el otro se remitió en formol al 10%, para realizar estudios anátomo e histopatológicos.

7. RESULTADOS

Los resultados obtenidos al examen clínico de los carneros se describen en el cuadro 7.

Cuadro 7: Resultados del Examen Clínico

NÚMERO DE CARAVANA	MANIFESTACIONES CLINICAS
2022	Orquitis y epididimitis izquierda
2363	No presenta
2364	Leve epididimitis derecha
2365	No presenta
2424	No presenta

Se encontraron manifestaciones clínicas compatibles con brucelosis en los reproductores N° 2022 (Figura 4) y N° 2364. Mientras que los carneros N° 2363, N° 2365 y N° 2424 resultaron clínicamente normales (Cuadro 7).



Figura 4: Carnero N° 2022

Para el diagnóstico serológico se remitió al Laboratorio Miguel C. Rubino (Di.La.Ve.) sueros de todos los animales debidamente identificados, para la realización de la técnica de IDGA.

Cuadro 8: Resultados Serológicos

NÚMERO DE CARAVANA	SEROLOGÍA
2022	Positivo
2363	Negativo
2364	Positivo
2365	Positivo
2424	Negativo

Obteniéndose resultados positivos para los individuos que presentaron manifestaciones clínicas y también para el carnero N° 2365, quien no las presentaba (Cuadro 8).

Cuadro 9: Resultados de la Evaluación Seminal

NÚMERO DE CARAVANA	VOLUMEN (ml)	COLOR Y ASPECTO	DENSIDAD	MOTILIDAD EN MASA	ANORMALIDADES (%)
2022	No se pudo extraer semen				
2363	0.6	Blanco cremoso	Denso	++	32
2364	Muestra insuficiente (Figura 5)				58
2365	0.5	Blanco lechoso	Semi denso	+	21 (Figura 5)
2424	No se realizó la extracción				

Al carnero N° 2022 no se le pudo extraer semen y al carnero N° 2364 se le extrajo una muestra de volumen insuficiente. De los dos animales que se obtuvieron muestras suficientes de semen para evaluar color, aspecto, densidad y motilidad en masa, se observó que el animal positivo a IDGA, presentaba una muestra de menor densidad, con color blanco lechoso y con menor motilidad en masa (Cuadro 9).



Figura 5: Colecta de semen insuficiente del carnero N° 2364 (izquierda). Anormalidades en semen del carnero N° 2365, se observa cola enrollada y alteraciones de la pieza intermedia (derecha).

Los testículos fueron remitidos al Laboratorio Miguel C. Rubino (Di.La.Ve.), en formol al 10%, para realizar estudios anátomo e histopatológicos (Cuadro 10) y refrigerados para realizar cultivo bacteriológico (Cuadro 11).

Cuadro 10: Alteraciones Patológicas

NÚMERO DE CARAVANA	ANATOMÍA PATOLÓGICA	HISTOPATOLOGÍA
2022	Epididimitis y disminución de la consistencia del testículo izquierdo	Espermiostasis y extravasación de espermatozoides en epidídimo. Infiltrado de células inflamatorias. En suma: Granuloma espermático
2364	Granuloma en cola de epidídimo y disminución de la consistencia del testículo derecho	Espermiostasis y extravasación de espermatozoides en epidídimo. Infiltrado de células inflamatorias. En suma: Granuloma espermático
2365	Epididimitis a nivel de cola y disminución de la consistencia testicular derecha	Infiltración intersticial de células inflamatorias en epidídimo
2424	Sin alteraciones	

Como se observa en el cuadro 10, los resultados macroscópicos del carnero N° 2022 muestran disminución de la consistencia en el testículo izquierdo y epididimitis de cola y cuerpo. A la histopatología, las lesiones demuestran la presencia de granuloma espermático (Figura 6).

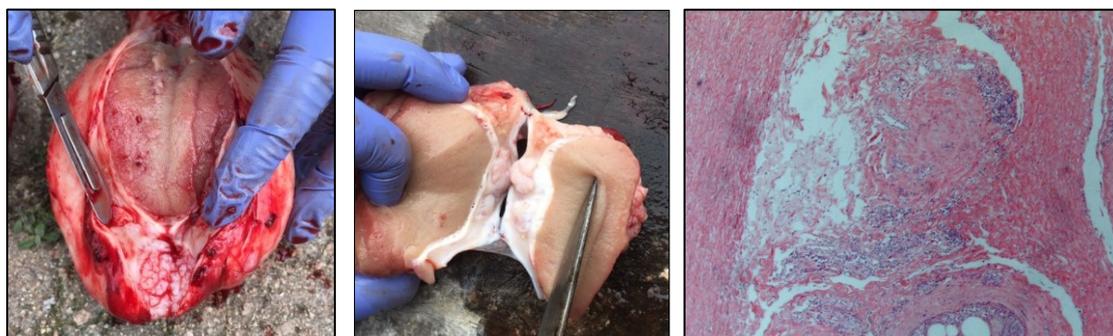


Figura 6: Anatomía Patológica e Histopatología del carnero N° 2022.

Los resultados macroscópicos en el carnero N° 2364 muestran un granuloma en cola de epidídimo (Figura 7) y en el N° 2365 epididimitis a nivel de cola (Figura 8). Ambos animales presentaron disminución de la consistencia testicular.

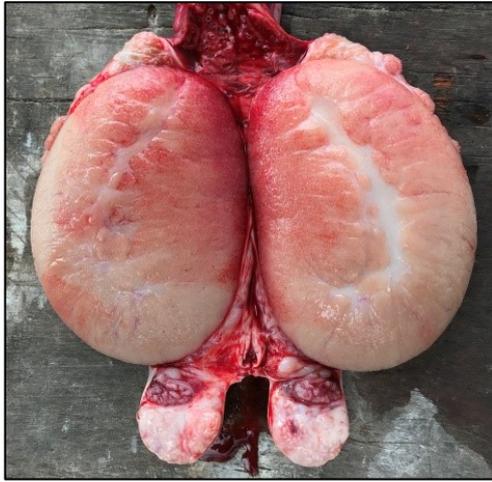


Figura 7: Testículo derecho del carnero N° 2364.

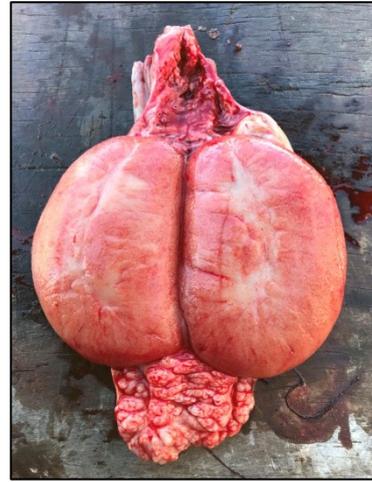


Figura 8: Testículo derecho del carnero N° 2365.

Cuadro 11: Cultivo Bacteriológico.

NÚMERO DE CARAVANA	CULTIVO
2022	Positivo
2363	No se realizó la orquiectomía bilateral
2364	Positivo
2365	Positivo
2424	Positivo

Como se observa en el cuadro 11, de todos los testículos remitidos para cultivo se aisló *B. ovis*.

8. DISCUSIÓN

La brucelosis ovina se ha descrito en la mayoría de los países productores de ovinos, pudiendo alcanzar su prevalencia hasta un 75% de los carneros (Radostits y col., 1999). En nuestro estudio de caso se detectaron 4 enfermos de un total de 5, lo que representa un 80%.

Según Bermúdez (2004) en la década del 60, en Uruguay en el 50% de los establecimientos y en el 10% de los machos reproductores, era posible aislar *B. ovis*. Casi seis décadas después no se han realizado nuevos relevamientos epidemiológicos nacionales, lo cual conduce a un desconocimiento de la situación actual de la enfermedad y a la necesidad de realizar nuevos trabajos de prevalencia.

Robles (2004) describe que el 70% de los machos afectados no desarrollan lesiones palpables durante largos periodos de tiempo. En nuestro caso solamente se identificaron anormalidades características de epididimitis contagiosa en dos animales, representando el 50% de los enfermos. Estos portadores si no son debidamente eliminados como reproductores, actúan como agentes perpetuadores y difusores de la enfermedad, tanto dentro como entre majadas. Por tal motivo como indicó Piquet (2004) realizar pruebas diagnósticas de laboratorio para identificar dichos animales es fundamental. Intentando de ésta manera, mantener la sanidad de la majada y procurando la comercialización de reproductores libres de *B. ovis*, lo cual no es común, ni es exigido en nuestro país.

En nuestro caso se identificaron 3 animales positivos mediante la prueba de IDGA. Cabe destacar que en el carnero N° 2424, el cual fue negativo a esta técnica, se aisló *B. ovis* a partir del testículo, lo cual sugiere que es necesaria la utilización de otra u otras técnicas con mayor sensibilidad, como ELISA o PCR. A pesar de esto, en Uruguay la técnica utilizada en la actualidad por el Laboratorio Oficial (Di.La.Ve.) es IDGA, debido a que es muy simple, fácil de interpretar y económica.

En el carnero la enfermedad se caracteriza inicialmente por una baja calidad seminal (Nozaki, 2003). En nuestro caso al carnero N°2022 no se le pudo realizar la extracción seminal, mientras que al N° 2364 se le extrajo una muestra de volumen insuficiente, probablemente debido a las alteraciones anatómicas encontradas. Al evaluar las características seminales, se observó que los animales positivos a las pruebas serológicas presentaban baja calidad seminal. En base al porcentaje de anormalidades espermáticas, Ax. y col. (2007) mencionan que, si bien todos los eyaculados contiene espermatozoides anormales, se debe cuestionar la fertilidad cuando estos ascienden al 20%. Cabe destacar que el individuo N° 2363 que presentó un porcentaje de anormalidades mayor al aceptable (32%), resultó serológicamente negativo a tres pruebas consecutivas, las cuales fueron realizadas cada 30 días como sugiere Oliveira (2011). Dicho porcentaje de anormalidades podría deberse a que éste animal fue sometido a una situación de estrés por un tiempo

prolongado fuera del establecimiento, que incluyó tratamientos médicos y transporte, lo que probablemente afectó la espermatogénesis. La misma tiene una duración de aproximadamente 60 días (Manazza, 2004) y la muestra seminal se extrajo antes de éste período.

Durante la cirugía del carnero N° 2022, al intentar exteriorizar el testículo izquierdo, se encontraron importantes adherencias entre la túnica vaginal y la albugínea del testículo. Estos hallazgos coinciden con los descritos por Ladds (1991) donde indica que pueden existir adherencias fibrosas o fibrinosas entre el órgano afectado y las túnicas adyacentes.

9. CONCLUSIONES

De este estudio de caso, podemos concluir que realizar el diagnóstico presuntivo de la epididimitis contagiosa basándonos exclusivamente en el examen clínico de los carneros no es suficiente, ya que existe un alto porcentaje de individuos portadores de *B. ovis* asintomáticos.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Agüero, G. (2012). Evaluación de las Características Seminales de Sementales Bovinos mediante el Analizador Seminal Computarizado., Tesis Universidad Central de Venezuela Facultad de Ciencias Veterinarias Instituto de Reproducción Animal "Dr. Abraham Hernández Prado", 71 p. Disponible en: http://saber.ucv.ve/bitstream/123456789/3292/1/T026800002626-0-Tesis_Final_Gloria_Aguero-000.pdf. Fecha de consulta: 14/11/2018.
2. Ax, R.L., Dally, M., Didion, B.A., Lenz, R.W., Love, C.C., Varner, D.D., Hafez, B., Bellini, M.E. (2007). Evaluación del semen. En: Hafez, E.S.E., Hafez, B., Reproducción e inseminación artificial en animales. México, McGraw-hill interamericana. p. 375-386.
3. Baigún, R., Conigliaro, A.S., Luna, F. (2000), Aislamiento de *Brucella ovis* y control de reaccionantes serológicos en epididimitis ovina. Veterinaria Argentina 162: 102-107.
4. Bermúdez, J., (2004). Control e inmunidad de *Brucella Ovis*. Seminario Actualización en problemas reproductivos de los ovinos del Mercosur, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay, p. 69-75.
5. Bonino Morlan, J. (2000). Evaluación clínica reproductiva del carnero., Revista del Plan Agropecuario 89:40-43.
6. Crespo, F., (1994). Brucelosis Ovina y Caprina., Paris, ed. Oficina Internacional de Epizootias, 451 p.
7. Carrera, J., Echavarría, F., Arechiga, C., Bañuelos, R., Tórtora, J., (2013), Consideraciones epidemiológicas en la prevalencia serológica de *Brucella ovis* en Zacatecas, México. Revista Mexicana de Ciencia Pecuaria 4:61-74.
8. Castrillejo, A., (1987), Enfermedades de los órganos genitales del carnero. En: Bonino Morlan, J., Duran del Campo, A., Mari, J.J. Enfermedades de los lanares. Montevideo, Hemisferio sur, V. 3, p. 87-94.
9. Dyce, K.M., Sack, W.O., Wensing, C.J.G. (1998). Pelvis y órganos reproductores masculinos de los rumiantes. En: Dyce, K.M., Sack, W.O., Wensing, C.J.G., Anatomía Veterinaria., México, McGraw-Hill, p: 795-796.
10. Escalera J.C., (2010). Aspectos de la infección de epididimitis del carnero por *Brucella ovis* y *mellitensis*., Tesis Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, 47p.
11. Fachini Costa, L., Sena Pessoa, M., Bitencourt Guimaraes, L., Silva Faaria A.K., A., Pereira Morao, R., Pinto da Silva Mol, J., Nunes Garcia, L.N., Almeida, A.C., Guimaraes Gouveia, A.M., Silva, M.X., Alves Paixao, T., Lima Santos, R., (2016). Serologic and molecular evidence of *Brucella ovis* infection in ovine and caprine flocks in the State of Minas Gerais, Brazil., BMC Research Notes 9. doi: 10.1186/s13104-016-1998-2.
12. Fernandez Abella, D., (200-?). Manual de inseminación por vía cervical en ovinos., Montevideo, SUL, 70 p.
13. Ladds, P.W. (1991), El sistema genital masculino. En: Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C., Palmer, N., Patología de los animales domésticos. Montevideo, Hemisferio sur, V. 3, p.453-571.

14. Leal Hernandez, M., (2009). Desarrollo de mutantes virB de *Brucella ovis*, para su estudio en los modelos celular y murino., Tesis Universidad Nacional Autónoma de México, 76 p. Disponible en: <http://132.248.9.195/ptd2009/junio/0644695/Index.html>. Fecha de consulta:26/04/2018.
15. Machado, G., Santos, D.V., Moek, I., Stein, M.C., Hein, H.E., Poeta, A.S., Vidor, A.C.M., Corbellini, L.G., (2015) Seroprevalence of brucella ovis in rams and associated flock level risk factors in the state of Rio Grande do Sul, Brazil., Preventive Veterinary Medicine 121:183-187.
16. Manazza, J. (2004). Examen Clínico-Reproductivo del Carnero. Disponible en: http://www.veterinaria.org/asociaciones/vet-uy/articulos/artic_ov/001/ov001bas.htm. Fecha de consulta:26/04/2018
17. Markey, B., Leonard, F., Cullinane, A., Maguire, D. (2013). Especies de Brucellas. En: Markey, B., Leonard, F., Cullinane, A., Maguire, D. Clinical Veterinary Microbiology. Dublin, Mosby, P. 327-332.
18. Mederos, A., (1995). Estudio epidemiológico y económico de *Brucella Ovis* en el departamento de Tacuarembó (Uruguay), INIA Serie Técnica N°69, 15 p.
19. Meglia, G., Gastaldo, M., Gomez, B., Dubarry, J., Oriani, S., Alvarez, N., (2008), Survey of sheep antibodies of smooth and rough strains of brucella in the north patagonic area of la Pampa., Ciencia Veterinaria (La Pampa), 10:09-12.
20. Méndez, M., Rodríguez, E.J., Sánchez, L.M., (2015). Brucelosis, una zoonosis presente en la población: estudio de series de tiempo en México., Revista Salud Pública México 57:519-527. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342015000600010. Fecha de consulta: 26/04/2018.
21. Nozaki, C., (2003). Investigación serológica de Brucelosis Ovina en cabañas registradas de la región centro-oeste del estado de sao paulo, atreves de las técnicas de inmunodifusión en gel de agar y ELISA., Tesis Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Estadual Paulista, 67p.
22. Oliveira, L., (2011), Medicina de Ovinos, Porto Alegre Ed. Pacartes, 195p.
23. Paolicchi, F.; Silva Paulo, P.; Solanet, C.; Eberhardt, A.; Malena, R.; Fiorentino, M.A.; Vigliocco, A. (2007), Aislamiento de *Brucella ovis* del tracto genital y leche de ovejas con persistencia de títulos positivos a ELISA, Revista de Medicina Veterinaria 88: 62-66.
24. Piquet, M., (2004), Aislamiento y serología de *Brucella Ovis*. Seminario Actualización en problemas reproductivos de los ovinos del Mercosur, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay, p. 46-51.
25. Radostits, O. M., Gay, C. C., Blood, D. C., Hinchcliff, K W. (1999). Enfermedades causadas por bacterias III. En: Radostits, O. M., Gay, C. C., Blood, D. C., Hinchcliff, K. W. Medicina veterinaria. México, interamericana. V. 1, p. 923-1053.
26. Ramos, J., Ferrer, L. (2007). Exploración del aparato genital. En: Ramos, J., Ferrer, L. La exploración clínica del ganado ovino y su entorno. Zaragoza, Servet. p. 269-284.
27. Rizzo, H., Gregory, L., Beraldi, F., Feola, A., Scarcelli, E., Paulin, L.M., (2014) Ocorrência de anticorpos anti-*Brucella ovis* em ovinos com

- histórico de distúrbios reproductivos no estado de São Paulo, Brasil., Archivo del Instituto de Biología de San Pablo 81:99-106.
28. Robles, C., (2004), Salud reproductiva en ovinos, Seminario Actualización en problemas reproductivos de los ovinos del Mercosur. Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay, p. 20-24.
 29. Robles, C.A., (2008), Brucelosis en carneros por *Brucella ovis*. Bariloche, INTA, 27p.
 30. Tiller, R., Gee, J.E., Lonsway, D.R., Gribble, S., Bell, S., Jennison, A.V., Bates, J., Coulter, C., Hoffmaster, A.R., De, B.C., (2010), Identification of an unusual *Brucella* strain (BO2) from a lung biopsy in a 52 year-old patient with chronic destructive pneumonia. BMC Microbiology 10(1):23.
 31. Tizard, I.R. (2009). Técnicas de inmunodiagnóstico. En: Introducción a la Inmunología Veterinaria. Barcelona, Elsevier, p. 269-284
 32. Troncoso, I., Gonzales, J., Navarrete, F., Lagos, A., Fischer, C., (2014), Comparación entre Palpación Testicular y ELISA Indirecto en el Diagnóstico de Brucelosis Ovina., Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú 25:557-561.