



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

**DIAGNOSTICO DIFERENCIAL EN CARNEROS
SEROPOSITIVOS Y SERONEGATIVOS
A *Brucella ovis* CON Y SIN EPIDIDIMITIS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**MEDICA VETERINARIA
ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A:

GRACIELA MENDEZ NAREZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. EFREN DIAZ APARICIO

ASESORES:

M. en C. J. FRANCISCO MORALES ALVAREZ

M. en C. FRANCISCO AGUILAR ROMERO

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
 INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE INVESTIGACIONES CUAUTITLÁN

INSTITUTO NACIONAL
 DE ESTADÍSTICA Y
 CENSOS

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

EXÁMENES DE
 CARRERAS PROFESIONALES

DR. JAIME KELLER TORRES
 DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLÁN
 P R E S E N T E .

ATN: Ing. Rafael Rodríguez Gehallos
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 20 del Reglamento General de Exámenes nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Diagnóstico diferencial en carneros seropositivos
y seronegativos a Brucella ovis con y sin epididimitis"

que presenta la pasante: Graciela Méndez Hírez

con número de cuenta: 8708214-6 para obtener el TÍTULO de:
Médica Veterinaria Zootecnista

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXÁMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
 "POR MI RAZA MAULARA EL ESPÍRITU"
 Cuautitlán Izcalli, Edo. de Mex., a 20 de Marzo de 1997

PRESIDENTE

M. en C. Rita del Castillo Rodríguez *Rita del Castillo Rodríguez*

VOCAL

HVZ. Jorge Alfredo Cuellar Ordaz *Jorge Alfredo Cuellar Ordaz*

SECRETARIO

Dr. Efrén Díaz Aparicio *Efrén Díaz Aparicio*

PRIMER SUPLENTE

Dr. Jorge Luis Tórtora Pérez *Jorge Luis Tórtora Pérez*

SEGUNDO SUPLENTE

HVZ. José Antonio Licea Vega *José Antonio Licea Vega*

DEDICATORIAS

A mis padres:

Gracia Nárez Nárez y Alfonso Méndez Sánchez por su cariño, apoyo y comprensión de toda la vida.

A mis hermanos:

Ma. guadalupe, Ma. Inés, Alfonso, Jaime, Ernesto y especialmente a José Luis y Arturo por todo su apoyo y consejos.

A mis sobrinos:

V. Alfonso, Arturo, Daniela, Susy, Frida V., Nallely N.

A Eduardo:

Por tu apoyo incondicional, gran paciencia y cariño de siempre, por todo, gracias.

AGRADECIMIENTOS

A Dios:

Por permitirme alcanzar esta meta

A mis asesores:

**Dr. Efrén Díaz Aparicio, M. C. J. Francisco Moráles Álvarez y
M. C. Francisco Agullar Romero por su apoyo, paciencia,
amistad y todo lo aprendido con ustedes lo cual me ayudó a
realizar este trabajo.**

Al Q. F. B. Víctor Tenorio G.:

**Por todos los conocimientos adquiridos y tiempo
dedicado a ello.**

A mis amigos:

**Por todos los momentos vividos en la Facultad y que son parte
de nuestra formación académica y personal.**

**A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM por los conocimientos
adquiridos en ella.**

Al CENID-Microbiología por su apoyo en la realización de este trabajo

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVOS	9
MATERIAL Y MÉTODOS	10
RESULTADOS	16
DISCUSIÓN	21
CONCLUSIONES	25
APÉNDICE	26
LITERATURA CITADA	31

RESUMEN

La brucelosis en ovinos puede deberse a *Brucella ovis* que afecta principalmente a machos y en menor medida a hembras, y a las brucelas lisas que causan más problemas en hembras que en machos, en ambos casos puede presentarse epididimitis u orquitis. La epididimitis infecciosa ovina es producida principalmente por *B. ovis* aunque se han asociado otros agentes infecciosos como *Actinobacillus seminis* e *Histophilus ovis*. El objetivo de este trabajo fue establecer la relación en el diagnóstico de *B. ovis* y *A. seminis* con la presencia de epididimitis clínica y aislamiento e identificación de los agentes etiológicos. Se trabajó en 6 rebaños ovinos localizados en los estados de México, Hidalgo y el Distrito Federal, se tomaron muestras de suero de 307 ovinos, 196 hembras y 111 machos y muestras de semen y/o testículos de 17 carneros. Se determinó por palpación y observación la presencia de epididimitis. A los sueros se les realizó la prueba de tarjeta al 3% para brucelas lisas, las pruebas de ELISA indirecta e inmunodifusión doble (IDD) con el antígeno proteico de extracción salina caliente para *B. ovis*. Para *A. seminis* se realizó IDD con antígeno soluble y suero control positivo producidos a partir de una cepa de referencia 15768 de *A. seminis* (ATCC). Se les realizó bacteriología a muestras de semen y/o testículos de machos con epididimitis. Para la identificación bacteriana, a los aislamientos obtenidos se les efectuaron pruebas bioquímicas rutinarias para *B. ovis*; para *A. seminis* se realizó además IDD con antígeno sonicado de los aislamientos bacterianos y de la cepa de referencia y suero control positivo. En los 6 rebaños se diagnosticó por serología la presencia de los dos tipos de brucelas; en *B. ovis* por IDD se detectaron 29 sueros positivos (9.4%), 19 hembras y 10 machos. En la prueba de ELISA indirecta se obtuvieron 43 sueros positivos (14%), 18 hembras y 25 machos en tanto que para brucelas lisas se encontraron 62 sueros positivos (20%), 42 hembras y 20 machos. Para *A. seminis* se obtuvieron por IDD 20 sueros positivos (6.5%), 10 hembras y 10 machos pertenecientes a 5 de los 6 rebaños muestreados. Se lograron dos aislamientos de *B. ovis* a partir de testículos y dos de *A. seminis* de muestras de semen, estos aislamientos fueron de animales que presentaban una orquitis o una epididimitis clínica. En base a los resultados de este trabajo se observa que la presencia o ausencia de epididimitis no se relaciona con animales seropositivos ni con aislamiento bacteriológico, ya que se aisló *B. ovis* y *A. seminis* de animales con y sin epididimitis clínica en carneros. La seropositividad de los ovinos a *B. ovis*, *A. seminis* y a brucelas lisas se considera elevada y se incrementa en la presencia de cuadros clínicos.

INTRODUCCIÓN

La población ovina nacional era de 5.9 millones de cabezas en 1995, concentrándose más del 50% del inventario en 9 entidades en orden de importancia: Estado de México, Hidalgo, Puebla, Veracruz, Tlaxcala, San Luis Potosí, Zacatecas, Chiapas y Guanajuato. Durante el periodo 1985-1994 se registró un incremento en la producción debido al aumento de peso al sacrificio, a mayores rendimientos, inclusión de ganado de importación y a la extracción de ganado destinado a pie de cría como respuesta a una elevada demanda. Como presión de esta última, se ha recurrido a la importación, cuyos volúmenes a partir de 1994 han superado el 50% del abasto nacional. El riesgo de introducción de enfermedades por la importación prevalece, atendiendo que de la importación de ganado para abasto con frecuencia algunos lotes son desviados en su trayecto hacia fines de cría y así pueden diseminar enfermedades infecciosas, como fue el caso de *B. ovis* cuyo primer aislamiento en México fue a partir de animales importados de los Estados Unidos de Norteamérica.⁸

En el primer trabajo sobre *B. ovis* en México²³ se obtuvieron 380 sueros de borregos Tabasco y se encontró que el 2.6% de ellos fue positivo a *B. ovis*. No fue sino hasta 1979 en que lograron aislar a *B. ovis* de sementales Suffolk en el estado de Guanajuato³³ los cuales habían sido importados tiempo atrás de los Estados Unidos de Norteamérica. Posteriormente se logró aislar *B. ovis* de muestras de semen. En todos estos trabajos se han encontrado anticuerpos contra *B. ovis* o se ha aislado, lo cual indica que la enfermedad está presente en el hato ovino nacional. Aunque para 1990 el inventario de cabezas de ovinos era de 5,840,000²³ los datos referentes a la infección de esta especie por brucelosis son muy escasos, por lo que no se pueden establecer parámetros de medición. Se considera de amplia importancia la cobertura diagnóstica utilizando antígenos apropiados de cepas rugosas y exigir la negatividad en pruebas diagnósticas de los animales importados.³³

La brucelosis causada por especies lisas es una zoonosis que afecta principalmente al ganado bovino, ovino, caprino, porcino, canino y en general a todos los animales de sangre caliente. En los animales la infección tiene diversas vías de penetración intra e

interespecificas causando abortos y aumento de la mortalidad perinatal asi como infertilidad. El humano contrae la enfermedad de manera directa durante el manejo de los animales o por ingestión de productos lácteos frescos contaminados.¹⁵

La brucelosis ovina es producida por dos especies principalmente: *Brucella melitensis* que es una bacteria lisa y *B. ovis* la cual se caracteriza por ser una bacteria rugosa. Aunque ambas especies pueden producir abortos y alteraciones testiculares, *B. ovis* parece poseer un tropismo especial por el carnero y sus tejidos, en el que produce un cuadro característico que se denomina epididimitis infecciosa de la cual no hay informes de que afecte al humano.⁶

El término de epididimitis en borregos se ha usado como sinónimo de infección por *B. ovis*. Sin embargo, no necesariamente es lo mismo, epididimitis se refiere a la inflamación de epididimo y es causada por diferentes microorganismos o traumatismos resultando en una baja calidad del semen. *B. ovis* provoca epididimitis en los carneros adultos los cuales se utilizan como sementales. Otros autores se refieren a la epididimitis en corderos que no han sido usados como sementales donde se asocian microorganismos como *Actinobacillus seminis* e *Histophilus ovis* aunque éstos microorganismos también se han aislado de carneros adultos con problemas de epididimitis.¹²⁻¹⁸

La influencia de la edad ha sido muy discutida ya que corderos que nunca habían sido usados como sementales se han encontrado serológicamente positivos a *B. ovis* y se piensa que los animales jóvenes son los más susceptibles. Sin embargo, se acepta que la genital es la principal vía de infección, la mayor parte de los autores coinciden en que los carneros adultos estarían más expuestos y se ha descrito un aumento de la incidencia de las alteraciones testiculares macroscópicas con la edad.¹⁹

Las bacterias *Actinobacillus* e *Histophilus* son consideradas como parte de la microbiota permanente o transitoria de las mucosas del tracto reproductor de los corderos. Causan infecciones ascendentes al epididimo y ocasionalmente al testículo y órganos sexuales accesorios, sin embargo los factores específicos que predisponen a éstos órganos a la infección no se han definido claramente. Estos microorganismos también pueden verse

involucrados en cuadros de artritis, laminitis, meningitis y septicemia³⁹. Otros microorganismos como *Actinomyces pyogenes*, *Bacteroides*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Haemophilus*, *Escherichia coli*, *Pasteurella*, *Staphylococcus* y *Streptococcus* pueden ser aislados de epididimo.

Aunque los agentes etiológicos principalmente involucrados en la epididimitis y la patogenicidad de la enfermedad son marcadamente diferentes ellos inducen lesiones en epididimo y testículo que no son diferenciables por palpación y cuadro clínico.³⁶

El género *Actinobacillus* se compone de bacterias gram negativas, de morfología bacilar, pudiéndose encontrar en pares y en raras ocasiones en cadenas. No presentan esporas, no son móviles, son anaerobios facultativos y tienen un metabolismo fermentativo. Su temperatura óptima de crecimiento es 37 C aunque pueden crecer en un rango de 20-40 C. Para su cultivo *in vitro* se requiere de medios enriquecidos con sangre o suero. Las características que permiten identificar a *A. seminis* son: negatividad a urea, indol y leche tomasolada, no hay acidificación de azúcares, pero después de 28 días de incubación pueden acidificar la arabinosa, fructuosa y trihalosa. *A. seminis* ha sido aislado en casos de epididimitis en carneros y la enfermedad es clínicamente indistinguible de la epididimitis producida por *B. ovis*.⁹

Las brucelas lisas son bacterias gram negativas que tienen forma de coccobacilos (0.5-0.7 um x 0.6-1.5 um), inmóviles, carecen de capsula, espora y flagelos. Son bacterias aerobias estrictas, pero pueden utilizar los nitratos y reaccionan positivamente en las pruebas de oxidasa, catalasa y ureasa. La temperatura de crecimiento óptimo es de 37 C y un pH de 6 a 7. No son hemolíticas, no acidifican los azúcares, no producen indol, no utilizan el citrato como una única fuente de carbono y dan resultado negativo en las pruebas de rojo de metilo. Las brucelas lisas crecen en medio selectivo de Farrell aunque también puede crecer en el medio de Thayer-Martin modificado.¹⁹

B. ovis se clasifica como una brucela rugosa por carecer de una cadena "O" similar a la presentada por las brucelas lisas la cual es un componente del lipopolisacárido (LPS) de membrana externa; requiere CO₂ para su crecimiento, crece selectivamente en medio de

Thayer-Martin modificado, produce aglutinación con acriflavina y es negativa a la prueba de ureasa y oxidasa, siendo estas las principales diferencias entre ambas.¹⁹

En su presentación natural *B. ovis* solo ha sido descrita en ovinos y éstos parecen ser la única especie susceptible, aunque se ha demostrado experimentalmente la susceptibilidad de los caprinos a esta bacteria. La enfermedad es especialmente importante en los machos, las hembras se ven afectadas por la consiguiente disminución de la fertilidad debido a la mala calidad de semen, solo ocasionalmente se llegan a producir abortos en el último tercio de gestación y en menos del 10% en una explotación.⁸

El mecanismo de transmisión más frecuente se debe a que los carneros infectados eliminan *B. ovis* en el semen incluso durante más de cuatro años después de la infección.²³ El contacto entre carneros con hábitos de homosexualidad es la forma más importante de transmisión de la enfermedad.²³ El contagio entre los machos se produce por la monta de los animales dominantes, mientras permanecen solos y separados de las hembras, durante el empadre o en los periodos fuera de este.²³ La penetración de la bacteria por vía rectal es más importante que por las vías oral, conjuntival y otras mucosas como resultado de la contaminación del ambiente o del alimento.²³ La transmisión por medio de la hembra se considera posible aunque de menor importancia, y no es relevante en los países con producción ovina y sistemas de pastoreo extensivo, dado los hábitos de comportamiento reproductivo de las ovejas las cuales tienden a formar un grupo alrededor de un macho. Esta vía podría, sin embargo, tener mayor importancia en las condiciones de manejo de México, con empadres no controlados y condiciones de hacinamiento en los corrales de encierro nocturno, donde puede producirse la monta de una oveja por más de un macho en un corto periodo. Estas condiciones podrían igualmente favorecer la penetración de la bacteria por otras mucosas al incrementar el microbismo ambiental, ya que *B. ovis* puede sobrevivir meses en el ambiente en condiciones favorables.²³

La *B. ovis* entra y produce una bacteremia alojándose en nódulos linfoides y siendo el epidídimo el órgano blanco. Una vez establecido, el organismo causa inflamación pudiendo irse a vesículas seminales o permanecer en epidídimo y salir en la eyaculación.¹⁰

El signo clínico característico de la epididimitis infecciosa es el aumento de tamaño, generalmente unilateral, del epidídimo. Este aparece aumentado tres o cuatro veces de su tamaño normal y tiene consistencia firme preferentemente en la región de la cola aunque también hay alteraciones en la cabeza del epidídimo. Las alteraciones en el cuerpo del epidídimo, aunque existen, son raramente perceptibles por palpación. Algunos animales infectados no presentan alteraciones testiculares detectables mediante palpación.¹⁵

Macroscópicamente la superficie del testículo al corte es blanca y puede haber salida de una sustancia cremosa y caseosa. A la palpación la túnica vaginal suele presentar adherencias con el epidídimo y ocasionalmente con el testículo. Las lesiones microscópicas iniciales en el epidídimo son edema e infiltrado de linfocitos y macrófagos en el tejido perivascular y también hiperplasia y metaplasia del conducto del epidídimo. Posteriormente, el tejido intersticial presenta una fibrosis con infiltrado más abundante de neutrófilos y células plasmáticas^{3,6}. Como resultado de la infección se da una inflamación, una respuesta autoinmune y estasis espermatocítica dando lugar a la formación de granulomas espermáticos produciendo la obstrucción de epidídimo¹¹. Los granulomas espermáticos y las adherencias con la túnica vaginal pueden originar lesiones en testículo, caracterizadas por estasis de espermatozoides, necrosis tubular con calcificaciones ocasionales y esclerosis. En las vesículas seminales y ampollas del conducto deferente se producen lesiones similares a las del epidídimo.^{3,6}

H. ovis y *A. seminis* pueden producir lesiones de tipo granulomatosas en la cola del epidídimo, sin embargo, son características las lesiones supurativas.²⁸

El diagnóstico de la epididimitis debe realizarse recurriendo a la observación y palpación de los testículos en los machos del rebaño¹¹, sin embargo, no tiene valor definitivo para el diagnóstico de la infección debido a que existen animales infectados que no presentan manifestaciones clínicas y a que una epididimitis puede aparecer como resultado de un traumatismo o causas infecciosas. Por lo tanto, es necesario recurrir a pruebas serológicas y bacteriológicas para establecer un diagnóstico preciso.¹⁵

El diagnóstico serológico se basa en la demostración de la presencia de anticuerpos frente a antígenos de *B. ovis*. Para ello se han aplicado una gran variedad de pruebas serológicas. Desde el punto de vista práctico, las pruebas con las que se obtienen mejores resultados son: Fijación del complemento (FC), inmunodifusión doble en agar (IDD) y ELISA indirecto con antígeno del extracto salino caliente (HS).¹⁹

Las ventajas que se obtienen al realizar la prueba de IDD es que es una prueba fácil de realizar, pues no se requiere personal altamente capacitado, económica y ofrece una especificidad del 100%; las desventajas que se presentan es la inestabilidad que puede presentar el antígeno al congelar y descongelar.²¹.

El aislamiento de los agentes etiológicos constituye el diagnóstico confirmatorio. La muestra más adecuada es el semen obtenido por electroeyaculación con las máximas medidas de esterilidad o de testículos y epididimo si se realiza la castración. Las muestras más idóneas tras la necropsia de los carneros infectados son el epididimo, vesículas seminales, ampollas del conducto deferente, linfonodos regionales y bazo. En la borrega el aislamiento se intenta a partir de placenta o de los fetos abortados (hígado, bazo, pulmón y contenido abomasal).^{4, 8}

La eliminación de los carneros con epididimitis detectados por palpación es una alternativa para el control, sin embargo existen carneros que no presentan alteraciones testiculares a la palpación. El empleo conjunto de las técnicas serológicas, bacteriológicas y la palpación antes y después de la época de empadre, detecta el mayor número de carneros infectados y permite reducir la tasa de infección desde el 30% a menos del 1% en alrededor de un año.¹⁶

En otros países, los programas de vacunación en machos han sido el único mecanismo de control de la brucelosis ovina, sobre todo si se tiene un nivel alto de infección. Se han evaluado una diversidad de inmunógenos en ovinos machos a diferentes edades. Las bacterinas de *B. ovis* emulsificadas han mostrado una relativa eficacia, sin descartar por supuesto, la interferencia que conlleva la vacunación con el diagnóstico de la enfermedad.^{4, 5}. La inoculación simultánea de la cepa vacunal de *Brucella abortus* viva (cepa 19) y bacterina de *B. ovis* incrementa el índice de protección hasta en un 80% comparada

con la aplicación de la bacterina sola (50%); sin embargo, bajo éste sistema se ha demostrado la localización de la cepa 19 en genitales y su eliminación en semen con el riesgo que esto tiene. Además, se han demostrado otras secuelas como epididimitis y laminitis^{4,5}. Este método induce una respuesta inmune humoral contra antígenos lisos y rugosos de *Brucella* por largos periodos^{4,5}. Varios autores han determinado que la vacunación con *B. melitensis* Rev 1 es eficaz contra la infección de *B. ovis* con criterios diferentes de evaluación y vías diferentes de inmunización^{4,5}. Se ha evaluado una doble inmunización con cepa Rev 1 a los tres meses con revacunación a los 14 meses, encontrándose una buena protección al desafío sin eliminación de la cepa vacunal y sin presentación de un cuadro clínico posvacunación.^{4,5}

OBJETIVOS

-Aislamiento e identificación de los diferentes agentes etiológicos que están involucrados en la epididimitis infecciosa en carneros.

-Establecer la relación en el diagnóstico serológico y bacteriológico de *B. ovis* y *A. seminis* con la presencia de epididimitis clínica.

-Determinar la presencia de anticuerpos contra brucelas lisas e intentar el aislamiento bacteriológico en cuadros clínicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se seleccionaron 6 explotaciones de ovinos siendo el criterio de selección la presencia de animales con epididimitis clínica y/o positivos en serología a *B. ovis* mediante la técnica de IDD. Las características de las explotaciones están detalladas en el apéndice 1.

En cada una de las explotaciones se realizó un examen clínico a los sementales. Asimismo se procedió a la extracción de muestras de sangre y semen de cada uno de ellos. El examen clínico de testículos se realizó por observación y palpación considerando la simetría testicular, desizamiento de los testículos en la bolsa escrotal para determinar la presencia de adherencias de las tunicas vaginales además de la consistencia y tamaño de epidídimo (cabeza, cuerpo y cola).

Las castraciones de machos con trastornos testiculares se realizaron cuando el productor lo permitió. Se trabajó con hembras en edad reproductiva tomándose muestras de suero al azar.

El número de hembras, machos y sementales muestreados por rancho así como el rango de edad se muestran en el cuadro 1.

TOMA DE MUESTRAS

Muestras de suero.

Se realizó la extracción de sangre (6-8 ml) de la vena yugular utilizando tubos al vacío. Después de la retracción del coágulo se procedió a centrifugar para la separación del suero manteniéndolo en congelación a -20 C hasta su evaluación.

Muestras de semen y tejidos.

El semen se obtuvo utilizando una vagina artificial o un electroeyaculador haciendo previamente un lavado del prepucio con agua y jabón. El semen se colectó en bolsas

estériles de plástico manteniéndolas en refrigeración a 4 C hasta realizar la siembra, la cual se llevó a cabo en un lapso no mayor de 6 horas.

Los testículos obtenidos de las castraciones se colocaron en bolsas de plástico y se mantuvieron en refrigeración a 4 C para procesarlos el mismo día y realizar los cultivos bacteriológicos.

Histopatología.

Se tomaron secciones de tejidos del epidídimo (cabeza, cuerpo y cola), así como de testículo. Estas muestras se fijaron en solución de Bouin durante 24 horas y al término de este periodo se lavaron con agua destilada y se conservaron en alcohol al 70% hasta su procesamiento. Los tejidos se procesaron para el estudio histopatológico y se tiñeron con la técnica de hematoxilina-eosina.²⁵

MÉTODOS SEROLÓGICOS

ANTÍGENOS Y CARACTERIZACIÓN

Obtención del extracto salino caliente (HS) de *B. ovis* .

Para la preparación del antígeno, se utilizó la cepa *B. ovis* Reo 198 CO₂ independiente. Para la obtención de la masa celular en la preparación del extracto antigénico se empleó caldo de tripticasa soya suplementado con un 2% de extracto de levadura. Los cultivos se realizaron en matraces en una incubadora con agitación constante a 250 r.p.m. a 37 C durante 36-48 horas. Como inóculos se emplearon cultivos frescos en tubos con agar sangre. Las células se cosecharon por centrifugación a 7 000 x g por 15 minutos. Una vez cosechadas, se lavaron dos veces con suero salino frío y se emplearon para la preparación del antígeno. El paquete celular se pesó, y se resuspendió en suero salino a una proporción final del 10 % peso /volumen y se pasaron a un matraz. La extracción se realizó en un autoclave a vapor fluyente a 100 C durante 15 minutos. Después de enfriar y centrifugar a 12 000 x g por 15 minutos a 4 C, se colectó el sobrenadante, y se dializó contra tres cambios (6-12 horas) de 50 volúmenes de agua destilada en total 3 por

50 volumen; se ultracentrifugó a 80 000 x g por 6 horas a 4 C. El sedimento se resuspendió en una pequeña cantidad de agua y se liofilizó.²⁹

Obtención del antígeno soluble de *A. seminis*

Este antígeno se obtuvo con el fin de detectar anticuerpos contra *A. seminis* en los sueros colectados. Para la obtención del antígeno se utilizó la cepa de referencia 15768 de *A. seminis* obtenida de American Type Culture Collection (ATCC), la cual se sembró en agar sangre a 37 C por 24-48 horas con 10% de CO₂ para después cosechar en SSF estéril y ajustar la concentración celular en el espectrofotómetro a una densidad óptica de 4.0 a 540 nm. La suspensión se incubó a 4 C por 24 horas y después se centrifugó a 8000 g por 15 minutos, el sobrenadante constituyó el antígeno.¹

Obtención del antígeno sonicado de *A. seminis*

Este antígeno se utilizó para identificación de cepas sospechosas de *A. seminis*. El antígeno se obtuvo a partir de la cepa de referencia de *A. seminis* la cual se sembró en agar sangre y se incubó en 10% de CO₂ por 18-24 horas a 37 C. Las bacterias obtenidas se cosecharon en 10 ml de SSF y se congelaron a -60 C por 48 horas. Una vez descongelado el contenido celular se sonicó por tres tiempos de 60%, 80% y 100% del poder del sonicador de un minuto con intervalos de 15 minutos de reposo, después se procedió a centrifugar a 1000 g por 10 minutos para obtener el sobrenadante el cual constituyó el antígeno.²¹

Análisis del antígeno HS de *B. ovis*

La cuantificación de proteínas se realizó con seroalbúmina bovina como patrón²⁴ (Sigma Chemical Co.). La cantidad de KDO, componente exclusivo del lipopolisacárido, se determinó utilizando como patrón una mezcla de KDO y desoxirribosa (Sigma Chemical Co.), esta última para corregir la interferencia debida a los desoxiazúcares⁴³.

Obtención del suero hiperinmune

Para obtener los sueros hiperinmunes, se inocularon por vía endovenosa, 2 conejos con la cepa de referencia de *A. seminis* a una concentración celular de 0,674 a una longitud de onda de 540 nm en el espectrofotómetro y 2 con *B. ovis* con una concentración celular de 0,284 a una longitud de onda de 600 nm. La inactivación de las bacterias se realizó con formol al 0.1 %.³

PRUEBAS SEROLÓGICAS

Inmunodifusión doble en agar para *B. ovis* y *A. seminis*

Se realizó mediante la técnica de Ouchterlony ³², utilizando porta-objetos como soporte. El gel para *B. ovis* se preparó con agarosa al 1.1 % en solución amortiguadora de borato (pH 8.3) con un 10 % de NaCl. La roseta utilizada estaba formada por 6 pocillos periféricos y uno central de 6 mm de diámetro con una separación entre ellos de 3 mm, en el pocillo del centro se colocó el antígeno HS, en un pocillo de la periferia se colocó el suero control positivo y en los demás pocillos los sueros problema.

Para *A. seminis* se realizó la misma técnica pero utilizando el antígeno soluble, un suero hiperinmune como control positivo y un gel que contuvo 0.5% de agarosa y 0.1 % de azida de sodio con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) a un pH de 7.2.

En cada uno de los pocillos se colocaron 16 μ l. Listos los gels y puestos los sueros problema se incubaron a 4 C y la lectura se realizó a las 72 horas. Los sueros problema se consideraban positivos cuando había una línea de identidad con la línea producida por el suero control positivo.

Imunodifusión doble en agar con antígeno sonicado para *A. seminis*

La IDD con el antígeno sonicado se realizó siguiendo los mismos procedimientos que la IDD con el antígeno soluble solo que esta prueba sirvió para la identificación de cepas sospechosas de *A. seminis*. Para identificar las colonias sospechosas se realizaron las pruebas bioquímicas primarias y después se realizó la técnica de IDD según Ouchterlony.³²

ELISA indirecto con antígeno HS para *B. ovis*.

Se realizó en microplacas de poliestireno Maxisorp (Nunc Inc.). El HS se utilizó a una concentración de 5 mg/ml en solución amortiguadora de boratos. Tras una titulación previa, el antígeno se pegó a las placas añadiendo a los pocillos 100 ul de la solución con antígeno e incubando una noche a 37 C sellando las placas con plástico para evitar la evaporación. El antígeno no adsorbido, se retiró mediante 3 lavados con PBS (0.01 M, pH 7.2) mas 0.05 % de Tween 20 (PBS/Tween). La técnica se realizó como sigue:

1. Incubación de 100 ul de suero problema diluido en 100 ul de PBS durante 60 minutos a 37 C.
2. Lavar 3 veces con PBS/Tween.
3. Incubación por 60 minutos a 37 C de 100 ul de conjugado previamente titulado utilizando proteína G conjugada con peroxidasa y diluida en 10 ml de PBS
4. Lavar 3 veces con PBS/Tween
5. Adición de 100 ul de sustrato e incubación en cámara oscura durante 20 minutos a temperatura ambiente. Como sustrato se empleo ácido 2-2 azinobis, 3-etil-benzotiazolina sulfónico (ABTS) (Sigma Chemical Co.), 5.5 mg en 50 ml de solución amortiguadora de citrato (0.05 M, pH 4) mas 19 ul de H₂O₂ al 1.2 %, la reacción se detuvo por adición de 25 ul de HCL 0.1 N.
6. Lectura de la densidad óptica a 450 nm en un espectrofotómetro, provisto de un registrador de datos. Para estandarizar los resultados, se tomó como referencia la densidad óptica obtenida para una sola dilución con uno de los sueros control positivo, elegido al azar. Todas las densidades ópticas de los demás animales, se convirtieron en porcentajes de ese valor. La dilución utilizada fue de 1:200 y el punto de corte se tomo del valor

obtenido en un estudio realizado previamente.¹² y que fue obtenido bajo condiciones similares y del cual se obtuvo una sensibilidad del 100% y una especificidad del 84%.

Prueba de Rosa de Bengala (RB)

La prueba de RB se realizó en placas de plástico depositando 0.03 ml de antígeno y 0.09 ml de suero y agitando lentamente durante 4 minutos¹¹, el antígeno utilizado fue el preparado a una concentración celular del 8% (Productora Nacional de Biológicos Veterinarios) para la identificación de brucelas lisas.

MÉTODOS BACTERIOLÓGICOS

Las muestras de semen y tejidos para el aislamiento de *B. ovis* se sembraron en medio de Thayer-Martin modificado (Apéndice 1), para el caso de los tejidos se tomaron muestras de epidídimo (cabeza, cuerpo y cola) y testículo que se maceraron con SSF estéril y se procedió a sembrar e incubar a 37 C con un 10 % de CO₂ durante 6-7 días. Con el fin de aislar otros posibles agentes etiológicos de la epididimitis: las mismas muestras se sembraron en agar sangre y agar chocolate modificado (Apéndice 2), incubándose a 37 C en condiciones de veibiosis y anaerobiosis durante 18-24 horas.

Para la identificación de las colonias sospechosas de *B. ovis* se procedió a la realización de una tinción de Gram y posteriormente se realizaron las pruebas bioquímicas primarias y secundarias como son: oxidasa, catalasa, urea, TSI, SIM y aglutinación con acriflavina.

Las colonias sospechosas de *A. seminis* se les realizó tinción de Gram y después se identificaron mediante las pruebas bioquímicas: urea, indol, leche tornasolada y las pruebas de acidificación de azúcares como arabinosa, fructuosa y trealosa. También se realizó IDD con antígeno soluble para su identificación.

RESULTADOS

A la palpación, 10 carneros (9%) de 111 evaluados presentaron alteraciones testiculares clínicas, presentándose la afección principalmente en animales de 3 a 4 años. Estos animales pertenecían a 4 de los 6 ranchos muestreados. Las lesiones encontradas a la palpación fueron una orquitis y/o epididimitis unilateral con un aumento de aproximadamente dos veces su tamaño normal presentando una consistencia dura y presencia de adherencias en tunicas vaginales. En las hembras no se notificaron casos de aborto.

Las preparaciones de HS para la prueba de IDD y ELISA indirecta contenían 45-65% de proteínas, mayoritariamente del grupo 3 de membrana externa, y 0.3-1.5 % de ácido 2-ceto, 3-deoxioctulosónico, correspondiente a un 10-55 % de lipopolisacárido rugoso.

La prueba de IDD para *B. ovis* fue positiva en 29 sueros (9.44%) de un total de 307 muestreados pertenecientes a 5 de las 6 explotaciones, siendo el único rancho negativo la explotación 6 ubicada en Tulancingo, Hidalgo, el número de hembras positivas 19 (9.69%) fue mayor que el de machos 10 (9%) (Cuadro 2).

A la prueba de ELISA indirecta para *B. ovis* resultaron 43 (15.63%) ovinos positivos de los 307 muestreados, siendo positivos un mayor número de machos 25 (22.5%) que de hembras 18 (9.18%), encontrándose en todos los ranchos por lo menos un animal positivo (Cuadro 2).

En la prueba de IDD para *A. seminis* se encontraron 20 (6.5%) animales positivos, que pertenecían a 5 de las 6 explotaciones muestreadas, el rancho negativo fue el mismo que en el caso de la IDD para *B. ovis*, el número de positivos para machos y hembras fue de 10 animales siendo de 5.1% para hembras y 9 % para machos (Cuadro 2).

En la prueba de RB se obtuvieron 62 (20.19%) ovinos positivos a brucelas lisas pertenecientes a 4 de los 6 ranchos muestreados siendo negativos la explotación 1 en

Apan, Hidalgo y la explotación 3 en Chalma, México, con 42 (21.42%) hembras y 20 (18.01%) machos (Cuadro 2).

En el estudio bacteriológico de semen se obtuvieron dos aislamientos de *A. seminis* de las 14 muestras trabajadas y de las 5 muestras de testículo y epidídimo (5 muestras) se obtuvieron dos aislamientos de *B. ovis* (Cuadro 2)

Las lesiones macroscópicas observadas en los testículos donde se aisló *B. ovis* fueron un aumento de tamaño de epidídimo y testículo con asimetría unilateral y a la palpación se donotaba la presencia de adherencias y engrosamiento de las tunicas vaginales. Al corte se observó salida de exudado amarillento de consistencia cremosa y al examen histológico se observó la presencia de granulomas localizados en testículo y epidídimo en sus tres porciones (cabeza, cuerpo y cola), presencia de quistes intraepiteliales, esclerosis de vasos sanguíneos e infiltrado de células mononucleares.

Como puede observarse en las pruebas serológicas para *B. ovis* resultaron 72(23.4%) ovinos positivos, 37 hembras y 35 machos; de los machos 25 (22.5%) no presentaban alteraciones testiculares aparentes y 10 (9%) de ellos tenían una orquitis y/o epididimitis diagnosticada al estudio clínico.

Los 10 carneros positivos en serología a *A. seminis* solo 2 (1.8%) presentaron orquitis y/o epididimitis clínica siendo también positivos a *B. ovis* en las pruebas serológicas.

Los dos aislamientos bacteriológicos de *B. ovis* correspondieron a carneros de raza Pelibuey y Suffolk que eran seropositivos a las pruebas de ELISA indirecta e IDD para *B. ovis* y a IDD para *A. Seminis*, pero solo uno de ellos presentaba alteraciones testiculares. Los dos aislamientos de *A. seminis* también fueron en carneros de raza Pelibuey que presentaban alteraciones testiculares pero serológicamente negativos a *A. seminis* y uno de ellos fue seropositivo solo a la prueba de ELISA indirecta para *B. ovis*.

Los resultados serológicos obtenidos de los machos de diferentes edades muestran que hay seropositivos a *B. ovis* y *A. seminis* con las pruebas de IDD y ELISA indirecta desde los 4 meses hasta los 5 años de edad.

Cuadro 1. Total de ovinos por rebaño y número de hembras, machos y sementales muestreados detallando rango de edad en machos

Rebaño	Animales totales	Hembras	Machos	Rango de edad (años)	No. Sementales
1	14	10	4	2 a 4	4
2	270	170	100	2 a 6	8
3	460	0	58	0.5 a 3	6
4	117	109	8	2 a 4	8
5	273	31	23	0.3 a 4	2
6	260	6	10	1 a mas de 4	10

Cuadro 2. Resultados de los estudios serologicos, bacteriologicos y clinicos para detectar y diagnosticar epididimitis causada por *B. ovis*, *Brucelas lisas* y *A. seminis* en ovinos de 6 rebaños.

Rebaño	Sexo	No. Animales	<i>Brucella ovis</i>		<i>Brucelas lisas</i>	<i>A. seminis</i>	Epididimitis Clínica	Aislamiento	
			IDD	ELISA				<i>B. ovis</i>	<i>A. seminis</i>
1	H	10	0	0	0	2	0		
	M	4	1	4	0	2	0		
2	H	10	6	10	6	2	0		
	M	8	1	3	4	0	4		2
3	H	0	0	0	0	0	0		
	M	59	5	8	0	4	2	2	
4	H	109	13	4	39	6	0		
	M	8	1	2	1	0	0		
5	H	31	0	4	6	0	0		
	M	23	2	6	5	4	2		
6	H	6	0	0	0	0	0		
	M	10	0	2	1	0	2		
TOTAL	H	196	19(9.69%)	18(9.18%)	42(21.42%)	10(5.1%)	---		
	M	111	10(9%)	25(22.5%)	20(18.01%)	10(9%)	10(9%)		
TOTAL ANIMALES		307	29(9.44%)	43(14%)	62(20.14%)	20(6.5%)	---		

H: Hembras M: Macho

Cuadro 3. Relación entre serología y aislamiento de *B. ovis* en ovinos con y sin epididimitis clínica

SEROLOGIA	AISLAMIENTOS	EPIDIDIMITIS
35 POSITIVOS	2 POSITIVOS	1
	33 NEGATIVOS	5 POSITIVOS
76 NEGATIVOS	76 NEGATIVOS	5 POSITIVOS
111 TOTAL	2 POSITIVOS TOTAL	34 POSITIVOS TOTAL

Cuadro 4. Relación entre serología y aislamiento de *A. seminis* en ovinos con y sin epididimitis clínica

SEROLOGIA	AISLAMIENTOS	EPIDIDIMITIS
10 POSITIVOS	10 NEGATIVOS	1 POSITIVO
101 NEGATIVOS	2 POSITIVOS	2 POSITIVOS
	99 NEGATIVOS	
111 TOTAL	2 POSITIVOS TOTAL	3 POSITIVOS TOTAL

DISCUSIÓN

La prueba de IDD con antígeno HS utilizada en el presente trabajo ha sido considerada como adecuada por diversos autores para el diagnóstico de la epididimitis causada por *B. ovis*.^{22, 26, 29, 30} En un trabajo se estudiaron 83 animales con infección comprobada por bacteriología encontrando 81 positivos a ELISA indirecta, 80 a IDD y 77 en FC.²⁶ En otro estudio comparativo se obtuvo una sensibilidad del 96.4% en IDD, 92.7% en FC y 97.6% en ELISA indirecta y una especificidad del 100% en todas, pero realizando la combinación de dos pruebas como ELISA indirecta e IDD se obtuvo la sensibilidad del 100%, por estas razones se recomiendan utilizar estas dos pruebas en combinación para el diagnóstico de *B. ovis*.

La prueba de ELISA indirecta es una prueba que complementa a la IDD pero de un costo más elevado por el material que se requiere para realizarla. Por tanto, la prueba tamiz para el diagnóstico de la epididimitis infecciosa producida por *B. ovis* es la IDD.³²

Es importante mencionar que para la realización de estas pruebas se debe utilizar el antígeno HS ya que es el que proporciona mejor sensibilidad y especificidad que los realizados a partir de LPS rugoso libre de proteínas y que los obtenidos por sonicación para el diagnóstico de *B. ovis*.⁴

Aunque por su sencillez el IDD resulta la prueba más recomendable, hay que hacer notar que el uso del HS en esta prueba no está exento de problemas, el más importante es la estabilidad del antígeno, la cual después de rehidratado, disminuye paulatinamente su título.³¹ En este trabajo se observó que el antígeno al ser congelado y descongelado perdía la capacidad de dar una línea clara de precipitación con el suero control positivo, este hecho se presentó a partir del tercer proceso de congelación-descongelación.

La presentación de la enfermedad determinada por la edad ha sido muy discutida.¹⁸ En el presente trabajo se encontró que aunque con menor proporción que los adultos había corderos desde cuatro meses de edad seropositivos a ambas pruebas

diagnósticas de *B. ovis*. Si se considera que la enfermedad es más común en animales adultos debido a los mecanismos de transmisión que incluyen como principal la directa carnero-carnero y otras menos relevantes como la vía oral y la pasiva venérea a través de la oveja como se presentaba en las explotaciones estudiadas; en otro estudio realizado se ha encontrado la enfermedad en ovinos jóvenes que nunca habían cubierto y opinan que los ovinos jóvenes son más susceptibles.²⁵ En el presente trabajo el rebaño donde se encontraron animales jóvenes positivos éstos eran sometidos a dominancia que incluía la sodomía por los animales adultos por lo que se piensa que ésta era la vía de contagio. Aceptando la genital como principal vía de infección la mayor parte de los autores coincide en que los adultos estarían más expuestos y que con la edad se aumenta el índice de alteraciones testiculares asociadas a *B. ovis*.^{26, 27, 28}

La seropositividad en corderos pudiera explicarse por la transmisión a partir de la oveja, esto a pesar de que a las hembras se les ha dado un papel poco importante en la epidemiología de la enfermedad²⁶; los datos obtenidos en este trabajo dieron un menor número de hembras seropositivas que de machos sin embargo, en estudios recientes se ha demostrado que hembras gestantes inoculadas con *B. ovis* tuvieron aborto en el último tercio de gestación, con eliminación de *B. ovis* en leche durante toda la lactancia y secreción vaginal del microorganismo.²⁶ Esto posiblemente explica porque hay corderos que son seropositivos, haciendo que la erradicación sea difícil si se basa en la eliminación o castración de machos positivos y no se toma en cuenta a las hembras como transmisoras de la enfermedad.

Por otro lado, es conveniente señalar que la epididimitis en corderos se encuentra más comúnmente asociada a microorganismo como *Actinobacillus* e *Histophilus* por lo que el diagnóstico diferencial incluye a éstos agentes.¹²

Como puede observarse en el cuadro 3, existen animales que son positivos a *B. ovis* en serología y no presentaron lesiones testiculares de igual manera en el cuadro 4 para el caso de *A. seminis*, esto puede deberse a que quizá tuvieron contacto con animales infectados y desarrollaron anticuerpos por exposición o que se encuentren en estado inicial de la enfermedad. De igual forma, existen animales seronegativos con alteraciones testiculares, lo que hace pensar que si bien la vía sexual es la principal

fueron de contagio se podría considerar que mientras no haya un contacto de la bacteria presente en sistema reproductor con el sistema inmune no habrá producción de anticuerpos contra el agente. Muchos autores coinciden en que no hay correlación entre epididimitis clínica y serología positiva.^{17,20,27,28,43}

La presencia de animales seropositivos y negativos al aislamiento es explicable porque varios autores coinciden en que la eliminación de *B. ovis* es en forma intermitente y en ocasiones la concentración bacteriana en semen es baja, lo que dificulta su aislamiento y recomiendan muestreos seriados para aumentar las posibilidades de aislamiento.^{8, 45} En este trabajo se realizó un solo muestreo ya que en la práctica es difícil debido a que los dueños de los animales no dan las facilidades necesarias para la realización de un segundo muestreo.

En el caso de *A. seminis* los primoaislamientos que se obtuvieron, fueron en forma pura y aunque se observaron variaciones en el comportamiento bioquímico, (como lo fue en la acidificación de los azúcares las cuales no acidificaban como se reportan), entre las cepas aisladas y aún entre la cepa de referencia y lo descrito en la literatura: se tiene la certeza de que los aislamientos correspondían a *A. seminis*, dado que esta bacteria pertenece a un grupo atípico de microorganismos de la familia *Pasteurellaceae* y las variaciones bioquímicas también están descritas en la literatura.²³ Al realizar la prueba de IDD, estos aislamientos dieron líneas claras de identidad con el antisuero obtenido con la cepa de referencia dejando poco lugar a dudas de que se tratase de otra bacteria. También se trabajaron como control y de manera simultánea antígenos obtenidos a partir de otras bacterias relacionadas antígenicamente como *Haemophilus* y *Pasteurella*, observándose líneas de precipitación pero no de identidad con *A. seminis* lo cual permitía la diferenciación de posibles reacciones cruzadas.

Para la determinación de anticuerpos contra *A. seminis* en sueros de ovinos, se observó un comportamiento similar a lo descrito anteriormente. En este caso se utilizaron como control antisueros de referencia contra *Pasteurella haemolytica* serotipo 1 y 2 que son los que generalmente se asocian a problemas infecciosos en ovinos, esto se comprobó en el rancho 5 en donde los ovinos habían sido bacterinizados contra *Pasteurella*, observándose un número elevado de animales positivos.

Los microorganismos *Histophilus* y *A. seminis* también han sido mencionados como causantes de reacciones cruzadas, aunque de débil intensidad con *B. ovis*.¹⁹ En la prueba de IDD para *A. seminis* y *B. ovis* se realizaron ensayos con el suero hiperinmune de *A. seminis* y suero de *B. ovis* observando que en ambas pruebas no se observó línea de precipitación, descartando una posible reacción cruzada.

Es importante mencionar que el porcentaje de animales seropositivos a brucelas lisas es significativo ya que en trabajos anteriores se había reportado la presencia de brucelas lisas en ovinos obteniendo un porcentaje de 28.2 % y 4.7 % de hatos positivos.^{12, 31, 37}

CONCLUSIONES

- La presencia o ausencia de epidididmitis clínica no se relaciona con animales seropositivos a *B. ovis* ni con el aislamiento bacteriológico de *B. ovis*.
- Se debe tomar en cuenta a las hembras en los programas de control de *B. ovis* ya que se observó que pueden ser transmisoras de la enfermedad.
- Se aislaron *B. ovis* y *A. seminis* de carneros con y sin epidididmitis clínica
- Se encontraron 72 (23.4%) ovinos, hembras y machos, seropositivos a *B. ovis*.
- Se encontraron 20 (6.5%) ovinos, hembras y machos, seropositivos a *A. seminis*.
- Se encontraron 62 (20.14%) ovinos, hembras y machos, seropositivos a brucelas lisas.

APÉNDICE 1

Explotación 1

Ubicación: Apan, Hidalgo.
Explotación: Ovinos
Raza: Suffolk, Romanov.
Alimentación: Soya, alfalfa achicalada
Fin zootécnico: Engorda
Total de ovinos: 50
Hembras: 40
Machos: 10
Sementales: 3
Profilaxis: Solo desparasitación interna.

Explotación 2

Ubicación: Topilejo, Distrito Federal.
Explotación: Bovinos, ovinos, caprinos
Raza: Pelibuey, Suffolk.
Alimentación: heno de avena, ensilado de maíz, concentrado de sorgo y soya.
Fin zootécnico: Docencia
Total de ovinos: 270
Hembras: 170
Machos: 100
Sementales: 8
Profilaxis: Vitaminas y desparasitación interna, eventualmente se aplican bacterinas contra clostridiasis y pasterelosis.

Explotación 3

Ubicación: Chalma, Edo de México.
Explotación: Ovinos
Raza: Pelibuey
Alimentación: Concentrado de maíz, pasta de Soya, harina de carne y hueso, minerales, urea, coccidiostatos y pastoreo.
Fin zootécnico: Engorda, recría y selección de sementales
Total de ovinos: 460
Hembras: 275
Machos: 185
Sementales: 6
Profilaxis: Desparasitación interna, toxoide contra enterotoxemia.

Explotación 4

Ubicación: Cuautitlán Izcalli, Edo de México.
Explotación: Ovinos, bovinos, caprinos y equinos.
Raza: Pelibuey, Suffolk, Columbia, Rambouillet.
Alimentación: Avena y alfalfa achicalada y pastoreo.
Fin zootécnico: Docencia.
Total de ovinos: 117
Hembras: 109
Machos: 8
Sementales: 8
Profilaxis: Desparasitación interna

Explotación 5

Ubicación: Metepec, municipio de Tulancingo Hidalgo.
Explotación: Ovinos
Raza: Hampshire y Suffolk
Alimentación: Cebada, silo, avena y pastizal.
Fin zootécnico: Producción de pie de cría.
Total de ovinos: 273
Hembras: 250
Machos: 23
Sementales: 2
Profilaxis: Desparasitación interna y vacunación contra pasterelosis.

Explotación 6

Ubicación: Tulancingo, Hidalgo.
Explotación: Ovinos y bovinos.
Raza: Hampshire y Suffolk.
Alimentación: Pastoreo mixto.
Fin zootécnico: Venta de sementales.
Total de ovinos: 260
Hembras: 250
Machos: 10
Sementales: 10
Profilaxis: Desparasitación interna y vacunación contra pasterelosis hemorrágica.

A. Medio de Thayer-Martin modificado

- Gc medium base..... 36 g
- Hemoglobina..... 10 g
- Agar bacteriológico..... 2 g
- Inhibidores:
 - Vancomicina..... 3 g
 - Colistina..... 7.5 g
 - Nistatina..... 100 000 U.I. (17.7 mg)
 - Nitrofurantoina..... 10 mg
- Agua destilada..... 1000 ml

El Gc medium y el agar bacteriológico se disuelven en 500 ml de agua destilada y calentar llevando a punto de ebullición y autoclavar (120 C. 20 minutos), enfriar en baño María hasta 50-55 C. La hemoglobina se disuelve poco a poco en 500 ml de agua destilada para evitar la formación de grumos y esterilizar de igual forma que el GC y el agar bacteriológico. Se mezclan las dos soluciones preparadas y se añaden los inhibidores para después servir en cajas de petri.⁴²

B. Medio de agar sangre

- Base agar sangre..... 40 g/l.
- Sangre desfibrinada estéril de bovino.....7- 10%

Disolver calentando hasta punto de ebullición para después autoclavar (115 lb. 15 minutos.) y posteriormente enfriar en baño María hasta 50-55 C y agregar 10% de la sangre estéril y servir en cajas de petri.

C. Medio de agar chocolate modificado

- Base agar cistina corazón.....51.5g/l.
- Extracto de levadura.....0.5%
- Suero estéril de bovino.....10%
- Sangre desfibrinada estéril de bovino.....10%

Se procederá a disolver agar cistina corazón y el extracto de levadura en agua destilada y disolver para llevarlo a punto de ebullición y después autoclavar (115 lb, 15 minutos). Inmediatamente después de salir del autoclave el matraz, se adicionará la sangre desfibrinada estéril de bovino para después enfriar a temperatura ambiente hasta que llegue a una temperatura de 50-55 C y enseguida agregar el suero de bovino.

LITERATURA CITADA

1. Aguilar,R.F., Trigo,T.E y Jaramillo,M.L,1986: Aislamiento de *Haemophilus somnus* a partir de pulmones neumónicos de bovinos.*Tec.Pec.en Méx* 52:67-68.
2. Baker,F.J. 1978.: Introduction to medical laboratory technology. *Butterworths*, London 5a ed.
3. Biberstein, E.L., M. E. Meyer y P. C. Kennedy. 1958: Colonial variation of *Pasteurella haemolytica* isolated from sheep. *J. Bact.* 76: 445-452.
4. Blasco, M. J. M. 1983 : La epididimitis contagiosa del morrueco (infección por *Brucella ovis*). *Revisión bibliográfica* Zaragoza,España . 46 pp.
5. Blasco, M., J. M. and Marin, C. M.1987 : Immunization with *Brucella melitensis* Rev 1 against *Brucella ovis* infection of rams. *Veterinary Microbiology*, 14: 381-392.
6. Blasco, M. J. M. 1990 : Epidemiología, Patogenia y Cuadro clinico.Brucelosis ovina. *ovis*.Tratado de Patología y Producción ovina. *Luzáns ediciones*. España. 8: 25-32.
7. Canto, J., Biberstein, E. L., Schulte, T. A. and Behymer, D. 1983 : Cross-Reactivity of *Haemophilus somnus* Antibody in Agglutination and Complement Fixation and in the Enzyme-Linked immunosorbent Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 17:3 500 - 506.
8. Confederación Nacional Ganadera. : La Ovinocultura Nacional. 1995.
9. Charles, C. T. 1966 : Diagnostic procedures in Veterinary. *Microbiology* 2a ed.*Carter G.R.* Springfield, Illinois USA.
10. Cleon,V.K. and Schweitzer,D. 1989 : *Brucella ovis*, Infection and Its Management in ovine reproduction. *Agri-Practice* 4: 36-39.

11. Díaz, A.E. 1993: Diagnóstico de Brucelosis Caprina. Tesis de Doctorado. *Universidad de Navarra*.
12. Díaz, A. E., Nuñez, T. E. D., Suárez, G. F., Marín A. C. y Blasco N. J. N. 1995: Evaluación de la sensibilidad y especificidad del ELISA para el diagnóstico de *B. ovis* en carneros. Memorias de la Reunión anual de la Asociación Mexicana de Técnicos Especialistas en Ovinos, Chapingo México.
13. Díaz, A. E., Blasco, N. J. N., Marín, A. C., Morillón, U. I. y Díaz, G. R. 1996 : Diagnóstico de *Brucella melitensis* en ovinos usando inmunodifusión radial con apteno nativo. *Técnica pecuaria en México*, 34:2, 99 - 103
14. Díaz, R.; Itoiz, A. I.; Dorronsoro, I.; Salvo, M. D. y Pardo, M. L. 1980 : Aplicación de la técnica de coagulación para la identificación de microorganismos pertenecientes al género *Brucella* y de los aglutinógenos A y M. Laboratorio Granada. España. 420:509-525
15. Ficapal, C. A. 1993 : Brucelosis ovina por *Brucella ovis*: Evaluación de pruebas diagnósticas y análisis de la incidencia en Cataluña. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. *Facultad de Veterinaria* 100 pp
16. Gnilo, M., J., Jiménez de Bagüés, C. M., Marín, M., Blasco, J. M. y Barberán, M. 1995: Infección experimental por *Brucella ovis* en ovejas gestantes. *VI Jornadas Sobre Producción Animal*, Tomo II 539 - 541
17. Giauffret, A. y Sanchis, R. 1974: Etude d'un foyer d'épididymite contagieuse du bétail. Erradication de la maladie. *Bull. O. I. E.*, 82: 581 - 586
18. Heath P. J.; Davies, I. H.; Morgan, J. H. and Aitken, I. A. 1991: Isolation of *Actinobacillus seminis* from rams in the United Kingdom. *Vet. Rec.* 129:304-307
19. Hernández, A. L. 1995: Curso de Diagnóstico bacteriológico de *Brucella ovis*. *Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias*.

20. Hughes, K. L. y Claxton, P. D.1968: *Brucella ovis* infection. *Aust. Vet. J.*, 44: 41 - 47
21. James, M. W., Smith, G. L. y Murdock, M. F.1978: Immunogenicity of a *Haemophilus somnus* bacterin in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 39:11 1756 - 1762
22. Jones, L. M., Dubray, G. y Marly, J.1975: Comparison of methods of diagnosis of *Brucella ovis* infections of rams. *Ann Rech Vet.*, 6: 11- 22
23. Low, J.C. Bromley, Y., Donachie, W. and Somerville, D.1994: Characterization of *Actinobacillus seminis*. Congreso HAP 1994. pp 35.
24. Lowry, O. M.:Rosebrough, M. J.; Farr,A.L. y Randall,R.J.1951:Protein measurement by folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
25. Luna. L.G 1968. Manual of histologic staining methods of the armed forces Institute of Pathology. 3rd. Ed. *Mac Graw Hill Book Company*. USA 36.
26. Marín, C. M., Jiménez de Bagües, M. P. Blasco, J. M., Gamazo, C., Moriyon, I. y Diaz, R.1989: Comparison of three serological test for *Brucella ovis* infection of ram using different antigenic extracts. *Vet Record*. 125: 504 - 508
27. McGowan, B.1979: Epididymitis in rams: effect of vaccination and culling on the clinical incidence of the disease *Cornell Vet*. 69: 67 - 72
28. Murray, R. M.1969: Scrotal abnormalities in rams in tropical Queensland with particular reference to ovine brucellosis and its control. *Aust Vet. J.* 45: 63 - 67
29. 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

30. Nuñez, T. E. D., Díaz A. E., Tenorio, G. V., Marín, A. C. y Blasco, N. J. M.1995: Evaluación de la sensibilidad y especificidad de la prueba de Inmunodifusión Doble con extracto salino caliente para el diagnóstico de *Brucella ovis* en carneros. Memorias de la Reunión Anual de la Asociación Mexicana de Técnicos Especialistas en Ovinos. Chapingo México.
31. Nuñez, T. E. D., Díaz, A. E. y Velázquez, O. F.1995: Presencia de Anticuerpos Contra *Brucella ovis* y brucelas lisas en sementales ovinos jóvenes. Memorias de la Reunión Anual de la Asociación Mexicana de Técnicos Especialistas en Ovinos. Chapingo México.
32. Ouchterlony, O. 1949 : Antigen-antibody reactions in gels. *Acta path microbiol. Scand.* 26:507
33. *Reunión Anual del Consejo de Sanidad Animal 1995* : Problemática de la *Brucella ovis* en México.
34. Riezu-boj,J.I., Moriyon,I., Blasco,J.M., Marín, C. y Díaz, R.1986: Comparison of lipopolysaccharide and outer membrane protein-lipopolysaccharide extracts in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella ovis* infection. *J. Clin. Microbiol.* 23:938-942
35. Riezu-boj,J.I., Moriyon,I., Blasco,J.M., Gamazo,C., Díaz,R. y Winter, A.J.1990 : Analysis by immunoblot of the antibody response of sheep infected by smooth and rough brucellae to outer membrane proteins extracted with hot saline. *Infect. Immun.* 58:489-494
36. Ris, D. R., Hamel, K. L. y Long, D. L.1984: Comparison of an enzyme-linked immunospecific assay with the cold complement fixation test for the serodiagnosis of *Brucella ovis* infection. *N. Z. Vet. J.* 32: 18 - 20

37. Romero M.J.A., Moreno, C.B., López, N.A., Tórtora, P.J.1995: Seroprevalencia de brucelosis en ovinos en un modelo de producción campesina en México. Memorias de la Reunión Anual de la Asociación Mexicana de Técnicos Especialistas en Ovinos, Chapingo México.
38. Sanchis, R y Giouffret, A.1975: L'epididymite contagieuse du bélier. *Rec Med Vet.* 151: 791 - 798
39. Scanlan, C.M.1992 : Etiopathogenesis of epididymitis in ram lambs. Memorias del 5- Congreso Nacional de Producción Ovina. *Asociación Mexicana de Técnicos especialistas en Ovinocultura.* México. 342-349
40. Thayer, J.D. y Martin, J. E.1964 : Selective medium for cultivating *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. *Publ Health Dpt.* U.S. 79:49
41. Trigo F.1992: Patología sistémica veterinaria. *Interamericana Mc Graw-Hill.* Segunda edición pp 221-222.
42. Walker, L. Richard; LeaMaster, R. Brad.1988 : Serodiagnosis of *Histophilus ovis*-associated epididymitis in rams. *J Vet Res.* 2: 208-212
43. Warren, L. 1959.1959: The thiobarbituric acid assay of sialic acids *J Biol Chem.* 234:1971-1975
44. Webb, R. F. Quinn, C. A., Cockram, F. A. y Husband, A. J.1980: Evaluation of procedures for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *Aust. Vet. J.* 56: 172- 175
45. West, D. M., Stafford, K. J., Alley, M. R., Badcoe, L. M., Hilbink, F. and Compton, C. W. R.1993: Serological and necropsy findings for rams infected with *Brucella ovis* which were not identified by the complement fixation test. *New Zeland Vet. J.* 41: 82 - 86