



10  
Sej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

“DETERMINACION DE LA INCIDENCIA DE Brucella  
ovis EN HEMBRAS DE UN REBAÑO OVINO CON  
ANTECEDENTES DE EPIDIDIMITIS EN UN SEMENTAL”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

AMADEO ARTURO BOIX SALAZAR

Director de Tesis: MVZ. CARLOS MANZANO CAÑAS



## **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 está 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.

## I N D I C E

RESUMEN .....	1
INTRODUCCION .....	3
Características del agente y de la enfermedad que produce .....	8
Características de <u>B. ovis</u> .....	8
Características antigénicas de <u>B. ovis</u> . ....	10
Signos de la enfermedad .....	12
Patogenia.....	12
Lesiones macroscópicas .....	13
Lesiones microscópicas .....	14
Diagnóstico .....	15
Localización y características de la explotación ovina utilizada .....	17
OBJETIVOS .....	19
MATERIALES Y METODOS.....	20
RESULTADOS .....	28
DISCUSION.....	32
CONCLUSIONES.....	36
BIBLIOGRAFIA.....	37

**RESUMEN**

El presente estudio se realizó con el fin de determinar la incidencia de B. ovis en hembras de un rebaño ovino, con antecedentes de epididimitis en un semental, e intentar el aislamiento e identificación de B. ovis, ya que en este rebaño uno de los dos sementales tenía un cuadro de epididimitis, mostró una serología positiva en pruebas de Fijación de complemento a B. ovis en estudios previos a este trabajo. Además de que este carnero convivió por algún tiempo directamente con las hembras de donde se realizaron los muestreos.

La explotación ovina de donde se tomaron las muestras, para realizar el presente ensayo, se localiza en el poblado de Visitación, Municipio de Melchor Ocampo, Edo. de México.

Se determinó la incidencia de B. ovis en 40 hembras, con base en tres muestreos serológicos, en los meses de enero, febrero y marzo de 1986, utilizando las pruebas serológicas de Coombs e Inmunodifusión en gel, con antígenos obtenidos a partir de B. ovis. Durante el mes de abril del mismo año, se castró a dicho semental que presentaba una marcada epididimitis, intentándose el aislamiento e identificación de B. ovis a partir de muestras de semen, testículo y cola de epididimo, estas muestras fueron inoculadas en dos medios diferentes; medio de Thayer-Martin modificado con nitrofurantoina y con

inhibidor VCN, y el medio agar chocolate enriquecido con base agar cistina-corazón suplementado con 10% de sangre de equino, 0.5% de extracto de levaduras y 10% de sangre de bovino. Estos cultivos fueron inoculados a 37° C, durante aproximadamente 48-72 hrs. en atmósfera de 5-10% de dióxido de carbono.

Obteniéndose en la prueba de Coombs la positividad en el primer muestreo fue del 30%, en el segundo de 37.5% y en el tercero de 37.5%, mientras que en la prueba de Inmunodifusión se encontró, en el primer muestreo de 0% de positividad, en el segundo del 10% y en el tercero de 15%.

El aislamiento de B. ovis, se consiguió a partir de la muestra de cola del apidídimo inoculada en el medio agar chocolate enriquecido, mientras que en los demás medios empleados no se obtuvo crecimiento del microorganismo, la identificación y determinación de la bacteria aislada como B. ovis fue mediante pruebas bioquímicas convencionales, además de que se realizó una prueba de Inmunodifusión doble utilizando antígeno preparado a partir de la cepa aislada y un suero control positivo a B. ovis.

## INTRODUCCION

Los ovinos han demostrado ser animales muy convenientes y suficientemente flexibles para satisfacer una gran variedad de necesidades del hombre. Esta especie ha hecho contribuciones significativas en la economía de algunos países. Los ovinos tienen las ventajas de presentar un tamaño reducido, alto índice reproductivo, gran variedad de productos, y un gran rango genético (41). La población ovina mundial ha crecido lentamente durante los últimos años. México cuenta con aproximadamente 5 millones de cabezas de ganado ovino, que en la actualidad contribuyen con el 1.2% del valor total de la producción agropecuaria, de los cuales 0.8% es de carne, 0.3% de lana y 0.1% de subproductos. A pesar de lo anterior se estima que existen más de 50,000 productores de ovinos en el país, de los cuales el 34% vive total o parcialmente de esta especie, y como fuente de empleo se deberán adicionar pastores, mano de obra eventual para realizar trasquila, desparasitaciones, cuidados al parto, entre otros. Finalmente los ovinos contribuyen importantemente en la ocupación artesanal e industrial (4).

La población ovina en México está constituida en un 95% por animales "criollos" o de características raciales indefinidas, y el 5% de los ovinos que habitan en México está constituido por razas puras dentro de las que se encuentran las siguientes:

- a) Rambouillet.- Se crfa bien en los estados de Zacatecas, S.L.P., Durango, y más estados del norte del país. (20, 37).
- b) Merino Australiano.- Estos animales fueron importados de Australia, en el año de 1982 por la S.A.R.H. (20). Esta raza es de gran utilidad para mejorar la producción lanar en los estados del norte del país (37).
- c) Suffolk.- Es bastante popular y se encuentra en los estados de México, Hidalgo, Tlaxcala, Puebla y Queretaro (20) y recientemente en S.L.P., Zacatecas y Guanajuato (37).
- d) Hampshire.- Se explota en los estados de México, Tlaxcala, Puebla, Queretaro, Hidalgo y Jalisco (20).
- e) Southdown.- Es poco conocido en México, se explota en pequeña escala en el estado de México, Hidalgo y Puebla (20).
- f) Dorset Horn.- Es una raza muy recomendada para el país ya que aydaría a mejorar los rebaños mexicanos ya que estos animales son prolíficos y buenos lecheros y se adaptan bien a terrenos bajos, accidentados y de poca vegetación (20).

- g) Romney Marsh.- En México existe un solo rebaño importado de Australia se localiza en el Centro Regional de Desarrollo Ganadero de la S.A.R.H. en el estado de Queretaro, esta raza es conveniente en zonas altas y frías de los estados de: Chiapas, Oaxaca y Michoacan (37).
- h) Lincoln.- Esta raza está cobrando importancia en el estado de México (20).
- i) Corriedale.- Esta raza se localiza principalmente en los estados de México, Puebla, Tlaxcala, Hidalgo, Chihuahua, Coahuila y Zacatecas (20).
- j) Blackbelly.- Es una raza que se localiza en regiones tropicales de Chihuahua, Veracruz y Mérida (20).



## CUADRO NUM. 1

## POBLACION OVINA EN LAS PRINCIPALES REGIONES OVEJERAS ('000).

AÑO	NUEVA ZELANDA	AUSTRALIA	U. R. S. S.
1980	68.825	136.166	149.432
1981	69.880	134.407	147.487
1982	70.300	137.900	148.401
1983	70.170	133.200	148.300
1984	69.700	136.500	151.400

Situación de la ovinocultura a nivel Mundial Memorias del curso de Bases de la Cría Ovina. Williams Huw. (1984). Tol-Méx.

## CUADRO NUM. 2

## ESTADOS PRODUCTORES DE OVINOS EN LA REPUBLICA MEXICANA (Núm. de cabezas)

ESTADO	1980	1981	1982	1983
MEXICO	727.123	732.514	738.482	694.512
ZACATECAS	687.367	691.991	698.070	656.962
HIDALGO	589.416	597.108	606.618	574.913
OAXACA	477.111	479.001	482.351	453.136
PUEBLA	420.476	425.756	429.526	404.232
S.L.P.	415.226	424.824	428.752	403.664
COAHUILA	363.168	364.153	366.127	343.405
CHIAPAS	320.390	335.769	343.978	328.728
VERACRUZ	293.836	294.836	294.836	277.798
MICHOACAN	222.650	230.944	236.144	225.256

S.A.R.H. Subsecretaría de Ganadería. Dirección General de Fomento Ganadero; Compendio Histórico Estadístico del Sector Pecuario 1972-1983.

k) Pelibuey o Tabasco.- Esta raza es recomendable para los trópicos (20).

Los Estados de México, Hidalgo y Puebla, son los que presentan mayor densidad ovina por Km.2, siguiendo los estados de Oaxaca, S.L.P., Coahuila Chihuahua (4). En el cuadro 2 se resumen el número de ovinos de los 10 principales estados productores de la República Mexicana.

En el País se realizan 2 Sistemas básicos de cría que son el intensivo y el extensivo, cuyas características se mencionan a continuación:

1) El extensivo.- Se realiza en el norte del país y los problemas más comunes son campos sobrepastoreados, elevada erosión, aguajes escasos, depredadores en gran número (coyotes), alimentación deficiente, los indicadores productivos son bajos (4).

2) El intensivo.- Se localiza en el centro y en el sur del país, se basa en pastoreo diurno con refugio nocturno, su alimentación es complementada frecuentemente, no existe manejo reproductivo, nutricional, ni sanitario, presentándose enfermedades parasitarias y microbianas. (4).

Los ovinos son susceptibles a infecciones bacterianas capaces de localizarse en los órganos genitales, produciendo cuadros clínicos típicos caracterizados por la notoria inflamación del epidídimo. La epididimitis ovina

se ha demostrado en la mayoría de los países en los que existen explotaciones borregeras, habiendo sido originalmente estudiada en Australia y Nueva Zelanda (35).

En México se demostró la enfermedad por primera vez en 1979, cuando se logró cultivar una cepa de Brucella ovis a partir de muestras de epidídimo y de testículos de un borrego de la raza suffolk (33). El brote más reciente ocurrió en 1984 en un rebaño localizado en el área del Ajusco en el Valle de México (35). La brucelosis ovina causada por Brucella ovis que se caracteriza en machos por producir una epididimitis y baja fertilidad, y en las hembras posiblemente por producir aborto en bajo porcentaje, esto determina la pérdida de corderos necesarios para obtener ingresos en substitución de los adultos antieconómicos. Por estas razones y por que ya existen antecedentes de esta enfermedad en México (14, 28, 33, 34, 35) se crea la necesidad de realízar investigaciones sobre esta infección.

#### Características del agente infeccioso y de la enfermedad que produce.-

Características de Brucella ovis: Es un cocobacilo gram negativo, inmóvil, no tiene cápsula, ni esporula (15). Sus medidas varían de 0.1 a 0.5 um por 0.3 a 1.5 um, son aeróbicos (34). El germen es catalasa positivo, oxidasa negativo, no produce H<sub>2</sub>S, ni hidroliza la urea (7). Requiere suplementariamente de 5 a 10% de CO<sub>2</sub> para su crecimiento, crece en presencia de fuscina básica y tionina, no reacciona con atisueros A

CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES DE LAS ESPECIES DEL GENERO *Brucella* Y SUS BIOTIPOS

Especie	Biotipo	Necesidad de CO <sub>2</sub>	Producción de H <sub>2</sub> S	Actividad Ureásica	Pruebas Bioquímicas			Agglutinación con sueros			Tijis		Reservorios más frecuentes	
					Cultivo de Colorantes			A	M	R	10.000x DPO	Bp2 BFO		
					Tionina a	b	Nitrosina básica c							
<u><i>B. melitensis</i></u>	1	-	-	Variable	-	+	+	+	-	+	-	-	Cabra, oveja	
	2	-	-	Variable	-	+	+	-	+	-	-	-	Cabra, oveja	
	3	-	-	Variable	-	+	+	+	+	-	-	-	Cabra, oveja	
<u><i>B. abortus</i></u>	1	+(-)d	+	1-2h <sup>e</sup>	-	-	+	+	+	-	-	+	+	Ganado vacuno
	2f	+	+	1-2h	-	-	-	-	+	-	-	+	+	Ganado vacuno
	3	+(-)	+	1-2h	+	+	+	+	+	-	-	+	+	Ganado vacuno
	4	+(-)	+	1-2h	-	-	+	+	-	+	-	+	+	Ganado vacuno
	5	-	-	1-2h	-	+	+	+	-	+	-	+	+	Ganado vacuno
	6	-	-0+	1-2h	-	+	+	+	+	-	-	+	+	Ganado vacuno
	7	-	-0+	1-2h	-	+	+	+	+	+	-	+	+	Ganado vacuno
	8	+	-	1-2h	-	+	+	+	+	+	-	+	+	Ganado vacuno
	9	-0+	+	1-2h	-	+	+	+	-	+	-	+	+	Ganado vacuno
<u><i>B. suis</i></u>	1	-	++	0-30 min	+	+	+	-	+	-	-	-	+	Cerdo
	2	-	-	0-30 min	-	+	+	-	+	-	-	-	+	Cerdo, liebre
	3	-	-	0-30 min	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Cerdo
	4	-	-	0-30 min	+	+	+	+	+	+	-	-	+	Reo ( <i>Rangifer tarandi</i> )
<u><i>B. neotomae</i></u>	1	-	+	0-30 min	-	-	+	-	+	-	-	-	+	Rata del desierto ( <i>Neotoma lepida</i> )
<u><i>B. ovis</i></u>	1f	+	-	Negativa	+	+	+	+	+	-	+	-	-	Oveja
<u><i>B. canis</i></u>	1	-	-	0-30 min	+	+	+	-	+	-	+	-	-	Perro

a) La diferenciación de las especies se hace en agar-tripticasa-soya o en agar triptosa con la siguiente gama de diluciones del colorante: a) 1:25 000; b) 1:50 000; c) 1:100 000. Las pruebas con cepas que requieren CO<sub>2</sub> deben hacerse en una atmósfera enriquecida con ese gas; las demás se realizan en atmósfera normal.

b) A= suero monoespecífico abortus; B= suero monoespecífico melitensis; R= suero antibrucelosis rubeasas.

c) Th= Tbilisi; DPO= dilución para pruebas ordinarias.

d) +(-)= Prueba generalmente positiva, pero pueden encontrarse variedades negativas, por ejemplo, la cepa 19.

e) El biotipo 544 es atípico por carecer de actividad ureásica.

f) Para el cultivo de *B. abortus* biotipo 2 y *B. ovis* es preciso añadir 5% de suero al medio de base.

(ALTON et al., 1976)

LAS TÉCNICAS DE LABORATORIOS EN LA BRUCELOSIS.

FAO/OMS.

y M monoespecíficos, pero es aglutinante con antisueros R, tiene reacción cruzada con Brucella canis (11).

Características antigénicas de Brucella ovis.- B. ovis tiene características particulares desde el punto de vista antigénico. Es un germen que aparece siempre en fase rugosa estable y está desprovisto de los antígenos de superficie características de Brucella en fases lisas. Se han caracterizado dos compuestos antigénicos específicos de la fase lisa (S) de las brucelas que son: El antígeno A + M y el Poly B. El antígeno A + M da las características de los aglutinógenos A y M y está constituido por un complejo macromolecular de proteínas, lípidos y polisacáridos, siendo responsable de las propiedades endotóxicas atribuidas al género Brucella, el antígeno polisacárido B es el responsable mayor de las propiedades antigénicas de la bacteria. Las cepas rugosas Brucella ovis y Brucella canis están desprovistas del antígeno A + M y del polisacárido B (7). El antígeno de brucelas (R), es común para brucelas en forma rugosa, sin embargo, se conocen además cepas que poseen determinantes antigénicos de especie y específicos en el antígeno (R) (30).

En Pruebas de Inmunodifusión y Fijación de Complemento con antígeno sonificado se detectaron inmunoglobulinas Ig G entre los 12 y 412 días después de la infección experimental (30).

CARACTERISTICAS DE LAS ESPECIES DE *Brucella*

AGLUTINACION CON:	<i>B. Abor- tus.</i>	<i>B. suis</i>	<i>B. meli- tensis.</i>	<i>B. ovis</i>	<i>B. nec- romae.</i>	<i>B. canis</i>
Suero Antibrucelas Lisas	+	+	+	-	+	-
Suero Antibrucelas Rugosas	-	-	-	+	-	+
Fermentación de Lactosa en Agar de Mac Conkey	-	-	-	-	-	-
Hemólisis en Agar-Sangre	-	-	-	-	-	-
Reproducción de ácido en Agar que cont. glucosa	-	-	-	-	-	-
Movilidad a 37° C	-	-	-	-	-	-
Movilidad a 22° C	-	-	-	-	-	-
Oxidasa Positiva	+	+	+	-	-	+
Ureasa Positiva	+	+	+	-	+	+
Reacción de Nitrato	+	+	+	-	+	+
Utilización de Citrato	-	-	-	-	-	-

(ALTON et al., 1976)

LAS TÉCNICAS DE LABORATORIOS EN LA BRUCELOSIS  
FAO/OMS.

Signo de la enfermedad.- La primera reacción en carneros es la baja calidad del semen y la presencia de leucositos y microorganismos en el mismo (8, 29). Lesiones características de los epidídimos, predominan do inflamación de la región caudal del mismo, con edema, fibrosis y ca seificación, fiebre de 41.7° C, depresión, aumento de la frecuencia respiratoria (8), además se pueden presentar cojeras por artritis sinovitis o artrosis (27). En las hembras se presentan los signos esporádicamente y pueden manifestarse por aborto, fallas en la ovulación y concepción; reabsorción embrionaria, puede ocurrir mortalidad peri y postnatal.

La enfermedad en los rebaños se caracteriza por una notoria reducción de la fertilidad (7, 34).

Patogenia .- B. ovis se elimina en los carneros por medio del semen, principalmente en animales con epididimitis y orquitis, también puede excretarse en la orina. En las ovejas el germen es eliminado a través de la placenta, descargas vaginales, leche y fetos abortados (34, 36). El semental, con o sin lesiones, transmite directamente la infección a través de la monta y el semen a las hembras sanas o por contacto prepucial o rectal a otro carnero, e indirectamente a través de una oveja (10, 34).

La infección ocurre frecuentemente por vía oral siendo la más común, si guiendo en importancia la vía conjuntival y genitales externos, así co-

mo por soluciones de continuidad por vía cutánea (36). Cabe señalar que la transmisión experimental de la infección de B. ovis, ha sido realizada por diferentes vías en hembras como son: intravenosa, subcutánea, oral, supraconjuntival e intrauterina (18).

Después de penetrar por cualquier vía la bacteria, pasa a ganglios linfáticos regionales y posteriormente pasa a sangre produciendo una bacteremia y finalmente se localiza en el epidídimo en los machos y en la placenta en las hembras.

#### Lesiones macroscópicas.-

a) En machos.- Tras la apertura de las bolsas escrotales, las tunicas vaginales suelen aparecer engrosadas, fibrosas y con adherencias entre la capa visceral y parietal, el epidídimo se encuentra aumentado y deformado de volumen con consistencia dura, sobre todo en la región de la cola. Además presencia de espermatoceles y abscesos (7, 22, 33).

Gunn et al (1942) demostró que epididimitis con espermatoceles estuvo presente en 5.3% de 6000 borregos examinados (17). En el testículo se observa orquitis, degeneración testicular, con focos necróticos bien delimitados (7, 22, 33).



b) En hembras que entran en contacto con B. ovis por primera vez se observa una cervico-vaginitis-mucopurulenta transitoria, salpingitis y endometritis (7). Procesos inflamatorios necróticos ulcerosos en la mucosa uterina (7, 16). La placenta se observa edematosa, engrosada, con periarteritis y arteritis, el amnios está adherido al corialantoides (22).

Los fetos aparecen moderadamente edematosos con líquido teñido de sangre y en cavidades serosas pueden encontrarse coagulos o bandas de fibrina (21, 22, 24), exudado supurativo en los bronquios, bronquiolos o alveolos (24).

#### Lesiones microscópicas.-

a) En machos.- Edema perivascular e infiltración linfocitaria de la cola de los epidídimos, el epitelio de los túbulos del epidídimo se observa hipertrofiado con degeneración hidrópica, infiltración de linfocitos y ocasionalmente presencia de células plasmáticas, hiperplasia del endotelio capilar, además de formación de múltiples quistes intraepiteliales (6, 21, 22, 23, 39).

b) En hembras.- Necrosis extensiva de los elementos epiteliales de los cotiledones con edema e infiltrado celular del estroma. Las células epiteliales del corion contienen abundantes microorganismos; en el feto los ganglios linfáticos presentan desarrollo de centros germinales

les y presencia de células plasmáticas en ganglios y bazo, además de nefritis intersticiales agudas (22).

#### Diagnóstico.-

1) Aislamiento bacteriológico; el aislamiento y la identificación del germen constituyen el único método de diagnóstico exento de error, sin embargo los resultados negativos del cultivo en semen no bastan para descartar la infección con B. ovis. El descubrimiento reciente de medios selectivos para aislar B. ovis (Brown y cols. 1971) ha hecho del aislamiento de esta Brucella una técnica de aplicación práctica y generalizada (3).

B. ovis es un organismo relativamente delicado, por lo tanto requiere enriquecimiento con suero o sangre para su aislamiento primario (9).

La bacteria crece selectivamente en el medio Thayer-Martin modificado con nitrofurantoina y con inhibidor VCN (contiene 300 g. de vancomicina, 7500 g. de colistina y 12500 UI de nistatina) (3,9). También crece bien en medios a base de agar soya-tripticosa enriquecido con 5-10% de suero ovino, estos medios se deben de incubar a 37°C en una atmósfera con 10-20% de CO<sub>2</sub> (5, 10, 14, 17, 18, 23).

B. ovis tiene características similares a Neisseria gonorrhoeae, por lo tanto se puede utilizar el medio de agar chocolate (9).

2) Serología; debido a que la bacteria se encuentra en forma rugosa y los antígenos comunmente empleados para el diagnóstico de la brucelosis, no reaccionan con los anticuerpos anti-B. ovis (40). Además de que en los ovinos se producen principalmente anticuerpos incompletos, sobre todo en infecciones crónicas, requiriendose pruebas específicas para detectar este tipo de anticuerpos (28).

Las pruebas serológicas más frecuentemente usadas para el diagnóstico de la Brucelosis ovina son:

- a) La fijación del Complemento; es la técnica más utilizada en países ovejeros (32, 34), es considerado el método más exacto para el diagnóstico de Brucella en ovejas (3). Sin embargo, tiene el inconveniente de requerir personal debidamente capacitado, material, reactivos y equipos adecuado (3, 34).
- b) La inmunodifusión en Gel; es una prueba sumamente sencilla, requiera poco material y equipo, no necesita experiencia previa para su realización e interpretación, y es sumamente económica (34) se ha encontrado una elevada correlación entre la Fijación del Complemento e Inmunodifusión (13, 31, 42). El inconveniente de la Inmunodifusión es que es una prueba cualitativa.

c) La prueba de Coombs; ~~es también llamada~~ prueba de la Antiglobulina, esta técnica fue desarrollada para demostrar la presencia de anticuerpos incompletos, su elevada sensibilidad y especificidad le han permitido superar a la prueba de Fijación del Complemento, y se considera la prueba que guarda la más estrecha relación entre la infección y reacción positiva, y es una prueba cuantitativa (12, 19).

Localización y características de la explotación ovina utilizada.- La explotación de donde se tomaron las muestras de suero, se localiza en el poblado de Visitación, Municipio de Melchor Ocampo estado de México, a latitud  $19^{\circ}$  y  $99^{\circ} 10'$  de longitud, con un clima templado seco y lluvias en verano y otoño, con una precipitación pluvial anual de 700 mm. Hg, correspondientes a la clasificación C. W. de Koepen (Tamayo 1962). La temperatura media anual es de  $15.5^{\circ}$  C, con una máxima de  $30.5^{\circ}$  C y una mínima de  $5.5^{\circ}$  C. El rebaño consta de 220 animales, de los cuales son 90 hembras mayores de un año encastadas de la raza Suffolk, Rambouillet y Criolla, 2 machos de la raza Rambouillet, uno de la raza Suffolk, y el resto de los animales son menores de un año.

Las Instalaciones cuentan con sombreaderos, comederos de cemento, bebederos con agua potable.

El manejo del rebaño es de tipo semiintensivo con pastoreo matutino,

saliendo a pastorear a las 8 AM. y regresando a las 12 Hrs. A.M. aproximadamente en cortes de alfalfa de maíz etc. Su alimentación posteriormente es suplementada dentro del corral con rastrojo de maíz molido y minerales. Los ovinos se desparasitan en base a los resultados de estudios coproparasitoscópicos, los cuales se realizan cada mes.

## OBJETIVOS

- 1.- Determinar la incidencia de Brucella ovis en los meses de enero, febrero y marzo de 1986, en un rebaño ovino comercial ubicado en el poblado de Visitación, Municipio de Melchor Ocampo, Estado de México, mediante las técnicas serológicas de Coombs y de Inmunodifusión en gel.
- 2.- Intentar el aislamiento e identificación de Brucella ovis en el rebaño.

## MATERIALES Y METODOS

### 1.- MATERIALES

#### 1) Biológico

- a) Se obtuvieron 40 sueros de ovinos hembras, que se recolectaron asépticamente de la vena yugular.
- b) La cepa de B. ovis fue proporcionada por el INIFAP.
- c) El antígeno soluble de B. ovis, que fue preparado en el INIFAP.
- d) El antígeno de célula completa de B. ovis fue preparado en el INIFAP.
- e) El medio de cultivo de tripticasa-soya, adicionado con 5% de suero estéril de bovino.
- f) Medio de cultivo de agar chocolate, con base agar cistina-co razón suplementado.
- g) Muestras de tejido testicular, epidídimos, y 5 ml. de semen de carnero de la raza Rambouillet, con un severo cuadro de epididimitis.

- h) Dos conejos hembras, clínicamente sanos de la raza Nueva Zelanda, con una edad de 6 meses, y un peso de 1.800 kg. aprox.

## 2.- METODOS

### I) Toma y envío de muestras:

Las muestras, fueron colectadas asépticamente de la vena yugular, utilizando una aguja estéril por cada animal, en tubos vacutainer con previa identificación.

Se realizaron 3 muestreos, entre intervalos de 21 días cada uno. Estas muestras sanguíneas, fueron transportadas al laboratorio de bacteriología en INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias), en donde se centrifugaron a 5000 rpm/10 minutos, con el fin de obtener el suero, estos sueros se mantuvieron a una temperatura de  $-20^{\circ}$  C. hasta el momento de su utilización.

### II) Prueba de Coombs:

#### a) Preparación del reactivo de Coombs:

- 1) Se diluyeron 60 ml de suero ovino, con 60 ml de sulfato de amonio (gota a gota) y en agitación magnética, a temp. de  $4^{\circ}$  C. La mezcla se centrifugó a 5000 rpm/15 minutos a temp. de  $4^{\circ}$  C.



- 2) Se desechó el sobrenadante, y el sedimento se resuspendió con agua destilada a los 60 ml. originales.
- 3) Posteriormente se agregaron 45 ml. de sulfato de amonio (gota a gota) y en agitación magnética la cual se mantuvo por una hora a temp. ambiente.
- 4) Se centrifugó a 5000 rpm/15 minutos a 4° C., se eliminó el sobrenadante y el sedimento se reconstituyó a 30 ml. con S. S. F. a PH 7.2
- 5) Al final de esto obtenemos gamaglobulina ovina + S.S.F. + sulfato de amonio.
- 6) A esta suspensión se le realizó dialisis, con el fin de eliminar el sulfato de amonio.
- 7) Las gamaglobulinas obtenidas se centrifugaron a 5000 rpm/15 minutos a 4° C, y se mantuvieron a temp. de -20°C, hasta su uso.
- 8) La gamaglobulina ovina 0.5 ml, más adyuvante completo de Freud 0.5 ml y 0.05 ml de emulsificante, se mezclaron hasta su homogenización.

- 9) Esta mezcla se le agregó antibióticos 1000 UI de penicilina y 10 mg. de estreptomina por ml.
  - 10) Esta suspensión se inyectó por vía intramuscular aprox. 1ml a cada conejo, semanalmente, durante 4 semanas.
  - 11) Diez días después de la última inyección se sangraron a las conejas y se obtuvo el suero que se utilizó como reactivo de Coombs.
- b) Obtención de microorganismos de Brucella ovis, para realizar la preparación del antígeno de célula completa:
1. Preparación del medio para cultivar B. ovis; se suspendieron 40 grs. de agar de soya tripticaseina en un litro de agua destilada, mezclando bien se calienta, agitando frecuentemente hasta que hierva durante un minuto. Después de que se disolvió, se esterilizó en un autoclave a temp. de 118° C a 121° C (no más de 15 libras de presión) durante 15 minutos, se dejó enfriar a 50° C y se le adicionó 5% de suero estéril de equino, se vertió en cajas de petrí, y se sometió a prueba de esterilidad (incubándolo a 37° C, durante 24 hrs.)
  2. Se tomó la cepa de B. ovis. proporcionada por INIFAP, y se procedió a realizar la siembra de microorganismos.

c) Preparación del antígeno de célula completa de B. ovis:

1. A cultivos de B. ovis (de 48 hrs.) se les agregó solución salina fenolada al 5% con 0.5% de fenol, y se dejaron en reposo durante 24 hrs.
2. Se cosecharon y se filtraron en gasa doble estéril.
3. Se lavaron 3 veces con solución salina al 0.85% y se estandarizaron de acuerdo a la concentración de microorganismos ya estandarizado se le agregó azida de sodio para preservarlo. Todo lo anterior se realizó en campo estéril, y al antígeno se le determinó proteína en base al método de Lowry (26).

d) Técnica para realizar la prueba de Coombs:

Se realizó la prueba en tubo por la técnica europea de aglutinación (3). Y se sometieron a la prueba de Coombs todos los sueros, mostrando o no aglutinación en la prueba antes mencionada.

La prueba de Coombs, consta de 2 fases, en la primera los anticuerpos específicos reaccionan dando un complejo primario no observable, donde los anticuerpos permanecen ligados a la pared celular. En la segunda fase los anticuerpos permanecen unidos a las células, y se comportan como un antígeno en la reacción con

el suero antigamaglobulina ovina dando una reacción observable. El suero que no reacciona en esta fase se considera libre de anticuerpos incompletos (12, 19).

### III.- Prueba de Inmunodifusión en gel:

a) Preparación del antígeno soluble de B. ovis para realizar la prueba de Inmunodifusión:

- a.1) Se cosecharon cultivos de B. ovis de 48 hrs.
- a.2) Se lavaron con solución salina al 0.85%
- a.3) Se centrifugó a 5000 rpm. y el sobrenadante se desechó y se determinó el peso del paquete celular.
- a.4) Este paquete se llevó a una concentración del 30% con solución salina.
- a.5) Se llevó a cabo la fragmentación de las bacterias por medio de ultrasonido durante 10 minutos.
- a.6) Posteriormente se centrifugó la suspensión bacteriana a 5000 rpm. durante 30 minutos, y el sobrenadante se utilizó como antígeno.

b) Técnica de la prueba de Inmunodifusión:

Se realizó empleando cajas de petrí de plástico, en las que

se colocó el medio de gel de agar noble, con un molde se realizaron perforaciones en el medio del gel 6 orificios, y uno central. El antígeno soluble de B. ovis, se colocó en el orificio central, mientras que en los orificios periféricos se colocaron los sueros problema. En cada serie de pruebas se incluyó un suero positivo y uno negativo como controles.

Las cajas se incubaron a temp. ambiente en una cámara húmeda. La lectura se realizó a las 24, 48 y 36 hrs. de incubación. La interpretación de los resultados, se hizo considerando positivos a todos los sueros que presentaron líneas de precipitación.

#### IV.- Aislamiento de Brucella ovis:

Obtención de muestras; a un carnero de la raza Rambouillet, que se encontraba en el mismo rancho, y que estuvo por algún tiempo conviviendo directamente con las hembras de las cuales se tomaron las muestras serológicas, para la realización del presente trabajo, mostraba una marcada epididimitis, y con serología positiva a B. ovis. Se le procedió a extraer una muestra de semen por medio de un electroeyaculador, esta muestra se colectó en un tubo de ensayo estéril. Inmediatamente después de esto, se proce

dió a castrar al carnero, obteniéndose los testículos y epidídimos.

Estas muestras biológicas (esperma, testículos y epidídimos) fueron inmediatamente transportados en una hielera al laboratorio de bacteriología en el INIFAP.

Se prepararon dos medios diferentes de cultivo para intentar el aislamiento de Brucella ovis:

- a) Medio de Thayer-Martin modificado con nitrofurantoina, y con inhibidor VCN (contiene 300 g. de vancomicina, 7500 g. de colistina, y 12500 UI de nistatina) (3). En este medio se realizó la siembra de semen, testículo y cola del epidídimo.
- b) Medio de agar chocolate enriquecido, con la única variante - que se utilizó como base agar cistina corazón (1). En este medio se realizó la siembra de semen, testículo y cola del epidídimo.

## RESULTADOS

El aislamiento bacteriológico, se intentó a partir de muestras de semen, epididimos, y testículos procedentes de un semental, el cual mostraba un cuadro de epididimitis, y que estuvo por algún tiempo conviviendo directamente con las hembras de las cuales se tomaron las muestras serológicas para realizar las pruebas de Coombs e Inmunodifusión en el presente trabajo.

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE COCMBS

1er. Muestreo	Número Sueros Positivos	Número Sueros Negativos	Por ciento Sueros Positivos
1.5	9	31	22.5
1.10	9	31	22.5
1.20	8	32	20.0
1.40	7	33	17.5
1.80	7	33	17.5
TOTAL:	40	160	$\bar{x}$ 20%

2do. Muestreo

Dilución

1.5	10	30	25.5
1.10	10	30	25.0
1.20	13	27	32.5
1.40	13	27	32.5
1.80	11	29	27.5
TOTAL:	57	143	$\bar{x}$ 20%

3er. Muestreo

Dilución

1.5	15	25	37.5
1.10	15	25	37.5
1.20	12	28	30.0
1.40	10	30	25.0
1.80	9	31	22.5
TOTAL:	61	139	$\bar{x}$ 30.5%



Inmunodifusión en gel.-

Después de incubar los sueros en cámara húmeda durante 24 a 48 hrs. Se realizó la lectura encontrándose:

- En el primer muestreo, todos los sueros, es decir, los 40 animales muestreados resultaron negativos.
  
- En el segundo muestreo resultaron positivos los sueros, 7, 8, 9, 26., es decir los 4 sueros positivos que representan el 10%
  
- En el tercer muestreo resultaron positivos los sueros 7, 8, 9, 18, 26, 32, es decir 6 sueros positivos que representan el 15%.

Aislamiento de Brucella ovis.-

Después de incubar durante 48 hrs. con 10% de CO<sub>2</sub> muestras de testículo, cola del epidídimo y semen en el medio Thayer-Martín modificado con nitrofurantoina y con inhibidor VCN (3), se observó que en todas estas cajas, resultaron negativas al crecimiento bacteriano. Mientras que en las cajas incubadas durante 48 hrs., con 10% de CO<sub>2</sub>, conteniendo las muestras de testículo, cola del epidídimo, y semen en el medio agar chocolate (1) con la única variante que se utilizó como base agar cistina-corazón, se observó el crecimiento de colonias rugosas, muy pequeñas en las cajas en donde se realizó la siembra de la cola del epidídimo, mientras que en

las cajas restantes resultaron negativas al crecimiento bacteriano.

Se realizó la determinación e identificación del microorganismo aislado, en base a pruebas bioquímicas (25). Obteniéndose que la bacteria resultó:

Catalasa	+
Oxidasa	-
Actividad ureasica	-
Utilización del nitrato	-
Producción del ácido sulfhídrico	-
Reducción del citrato	-
Fermentación de lactosa en agar Mac Conkey	-

Además de que con esta cepa aislada, se preparó un antígeno, y se corrieron pruebas de Inmunodifusión doble utilizando sueros controles positivos a B. ovis y sueros negativos, observándose líneas de precipitación con los sueros positivos a B. ovis. Por lo tanto el microorganismo aislado se identificó como Brucella ovis.

## D I S C U S I O N

Los anticuerpos séricos de Brucella ovis en ovinos, pueden ser detectados por técnica de aglutinación (Buddle 1954) (13), Hemaglutinación indirecta (Ris y Te Punga, 1963) 13, inmunodifusión (Mattheus y Trueblood, 1976; Myers, 1970) (13), fijación de complemento (Clapp, 1955, Clapp, 1961), e inmunofluorescencia entre otras (13). La sensibilidad y la especificidad de cada una de estas pruebas es difícil de evaluar, más aún cuando no se tiene seguridad plena de que los animales están afectados, sobre todo si el semental del rebaño presenta un cuadro clínico de epididimitis, ya que esta alteración no siempre es causada por Brucella ovis.

El aislamiento del microorganismo en cultivos específicos es el mejor método de determinar la presencia de la bacteria en el animal. Sin embargo un resultado negativo en el cultivo, no es indicativo de que el animal esté libre de la infección (Lavis, et al. (1972) (13).

Hartely, et al., (1955) (18), demostró que la infección causada por Brucella ovis puede desarrollarse en la borrega sobre todo cuando con viven con machos infectados, pero Buddle (1955) (18), sólo encontró aglutininas en el suero en dos borregas de 25 las cuales convivían con 5 machos infectados. Por otra parte (Clapp, et al. 1957; Snovidon 1957; Keogh et al 1958) (18), han reportado la presencia de anticuerpos de

Brucella ovis por medio de la prueba de fijación de complemento en borregas que conviven con machos experimentalmente infectados.

La transmisión de Brucella ovis a la borrega ha sido probada por vía: intravenosa, oral, subcutánea, conjuntival e intrauterina (18) los resultados de estas vías de transmisión no han tenido un efecto severo en la borrega gestante, ya que el aborto o los nacimientos de corderos débiles han sido pocos.

Por otra parte Lidal and Kirkbrige, (1983) lograron aislar Brucella ovis de fetos abortados detectando lesiones en placenta y pulmón. Estas investigaciones indican los resultados contradictorios que en este sentido se han dado.

Los resultados obtenidos de las pruebas serológicas practicadas en el presente trabajo, no concuerdan entre sí, lo que puede indicar alguna falla en el procedimiento o en la sensibilidad y especificidad de las pruebas, lo que sí es evidente es que las borregas del rancho tienen anticuerpos de Brucella ovis, y si a esto agregamos que fue posible aislar el gérmen del semental que convivió con las borregas por algún tiempo, queda demostrada la importancia que puede tener la convivencia de sementales afectados con las hembras.

Los hallazgos obtenidos con la prueba de Coombs, cuya sensibilidad y es-

pecificidad son elevadas, nos permiten suponer que el rebaño está infectado sin haber podido evaluar los efectos directos de éste microorganismo en las borregas.

El hecho de haber encontrado un mayor porcentaje de sueros positivos con la prueba de Coombs, puede explicarse en el sentido de que los ovinos crónicamente afectados, presentan anticuerpos incompletos y la prueba de Coombs a diferencia de la Inmunodifusión en gel sirve para detectarlos.

Con respecto al aislamiento de Brucella ovis, de la cola del epidídimo de un carnero con cuadro clínico de epididimitis, y positivo a la prueba de Fijación de complemento, en el medio de agar chocolate utilizando como base agar cistina corazón, representa un primer antecedente de su utilidad, ya que con anterioridad dicho medio fue aplicado por Aguilar y Trigo (1985) para el aislamiento e identificación de Haemophilus scarnus en México (1), lo anterior demuestra y concuerda con las observaciones de Brown et al (1971), De la Peña, Feldman (1985), de que B. ovis tiene un comportamiento y necesidades diferentes a otras especies de Brucella y es importante el uso de medios de cultivo enriquecidos para su aislamiento.

Brown, et al. (1971) indica que los procedimientos serológicos para el diagnóstico de B. ovis no siempre concuerdan con los hallazgos obtenidos del semen, esto puede ser debido a fallas en los medios de cultivo,

lo que hace a ésta técnica de diagnóstico poco práctica en forma rutinaria.

En el presente trabajo el cultivo del semen, testículo y cola del epidídimo en el medio comercial Thayer-Martín modificado con nitrofurantoina y con inhibidor VCN, resultó negativo a crecimiento bacteriano lo que no indica una evidencia de ausencia de la infección ya que dicho semental resultó varias veces positivo a B. *ovis* en pruebas de fijaciones de complemento y además se logró en aislamiento en otro medio antes mencionado. Por lo tanto la recomendación de Brown et al (1971), de no dar a un macho como negativo a la infección, sin antes haber resultado tres veces negativo a crecimiento en diferentes etapas del mismo medio es válida, y queda comprobada al haber obtenido crecimientos de las muestras de material biológico inoculadas en el medio de agar chocolate utilizando como base agar cistina corazón.

## CONCLUSIONES

- 1.- La prueba de Coombs, resultó ser más eficaz que la prueba de Inmunodifusión en gel en éste trabajo.
- 2.- Resultados negativos del cultivo de tejido testicular, epidídimo o semen, no indican que el animal sea negativo a la infección por Brucella ovis, más aún cuando serológicamente los resultados han sido positivos.
- 3.- El medio agar chocolate enriquecido utilizado como base agar cistina corazón podría ser de utilidad para el cultivo de Brucella ovis.
- 4.- Debido a las diferencias antigénicas entre cepas rugosas y lisas de Brucella es necesario, para el diagnóstico de Brucelosis por B. ovis, desarrollar en los centros de diagnóstico regionales y centrales, técnicas sensibles y específicas que nos permitan tener un diagnóstico.
- 5.- Es necesario conjuntar la historia clínica, cuadro clínico, pruebas serológicas con los resultados obtenidos en el cultivo de mues tras de un animal que se sospecha de Brucelosis, más aún cuando el resultado de éste último es negativo.

**B I B L I O G R A F I A**

1. Aguilar R. F., Trigo T. E. (1985) Aislamiento e Identificación de Haemophilus somnus en México. Resúmenes de la reunión anual del INIP en México. pág. 58.
2. Alton G. C. (1973) La Brucelosis en Cabras y en las ovejas. Revista Mundial de Zootecnia No. 5 pág. 16-20.
3. Alton G. C., L. M. Jones y D. E. Pietz (1976) Las Técnicas de la Brucelosis FAO/OMS. segunda edición. págs. 175
4. Arbiza A. S. (1984) Estado actual de la ovinocultura en México Perspectivas. Memorias del curso Bases de la cría ovina. Toluca-México FESC-UNAM. 28-35.
5. Bagley C. V., Paskett M.E. (1985) Prevalence and causes of epididymitis in Utha. J. Am. Vet. Ass. 86 No. 8 pág. 798-801.
6. Biberstein E. L., Mc Gowan B., Olander H., and Kennedy P. C. (1963) Epididymitis in Rams Studies on pathogenesis. Cornell Vet. 54: 27-41.
7. Blasco Martínez J. Ma. (1973) La epididimitis contagiosa del morrueco (infección por Brucella ovis) Revisión Bibliográfica Instituto



Nacional de Investigaciones Agrarias. Madrid España págs. 47

8. Blood D. C., J. A. Henderson y O. M. Radostitis (1982) Medicina Veterinaria edit. Interamericana. México, quinta edición. págs. 1193.
9. Brown G. M., Ranger C. R. and Kelley D. J. (1971) Studies media for the insolation of Brucella ovis. Cornell Vet. 63: 29-40.
10. Brown G. M., D. E. Pietz (1973) Studies on transmission of Brucella ovis infection in rams. Cornell Vet. 63: 29-40.
11. Carbel M. J. and W. J. Bringley Morgun (1981) Clasificación of Genus Brucella; The current position. World Health Organization. Organization Mondiale de la Sante. pág. 8.
12. Casas Oloascaga R. (1976) Diagnóstico Serológico de la Brucelosis. Centro Panamericano de Zoonosis OPS/OMS 127-128.
13. Cox J. C., Gorrie., R. C. Nairn, and H. A. Ward (1977) A Comparison for the Serological diagnosis of Brucella ovis infection. Br. Vet. J. 133: 442-445.
14. De la Peña M. A., Feldman S. D. (1985) Aislamiento de Brucella ovis

- a partir de muestras de semen de carneros con epididimitis. Resúmenes de la reunión anual del INIP en México. pág 44.
15. Hagan y Bruner (1984) Enfermedades Infecciosas de los animales domésticos 4a. edición Edit. La Prensa Médica Mexicana S. A. págs. 816.
  16. Hiepe Th. H. (1975) Enfermedades de la oveja Edit. Acribia España. págs. 391.
  17. Hughes K. L., Claxton P. D. (1968) Brucella ovis infection. Aust. Vet. J. 44: 41-47.
  18. Hughes K. L (1972) Experimental Brucella ovis in ewes. Am. Vet. J. 48: 12-17.
  19. Iturbide Ramírez Raymundo (1978) Evaluación de las pruebas de Coombs e Inmunofluorescencia indirecta como métodos de Diagnóstico de la Brucelosis porcina. Tesis Lic. FMVZ. UNAM.
  20. Jalil J. G. (1984) Principales razas ovinas criadas o de interés para México. Memorias del curso Bases de la Cría ovina Toluca México págs. 36-42.
  21. Jensen (1982) Diseases of sheeps. second edition. Lea and Febiger, Philadelphia págs. 317.

22. Jubb, K.V.F. and Kennedy P. C. (1970) Pathology of domestic animals. 2da. edition Academic Press, vol. I, New York. U.S.A. págs. 463.
23. Laws L. Simmons, Andludford C. G. (1972). Experimental Brucella ovis infection in Rams. Aust. Vet. J. 48: 313-317.
24. Lidal M. C. and Kirkbride (1983) Brucella ovis induced abortion in ewes. J. Am. Vet. Ass. 183: 553-554.
25. López Alvarez J., Barajas Rojas J. A. (1982) Manual de laboratorio para Bacteriología y Micología Veterinaria FMVZ. UNAM.
26. Lowry O. H., N. J. Rosebraugh A. L., A. I. Farr and R. J. Randall (1951) Protein Measurent whit the Folinphenol reagent J. Biol. Chem. 193: 265.
27. Martínez J. M. Conde (1975) guía del Inspector Veterinario Titular 2. Epizootiología y Zoonosis. Biblioteca AEDOS Barcelona España. Págs. 408.
28. Martínez Yrizar E. (1974) Presencia de anticuerpos contra Brucella ovis y Brucella melitensis en sueros de borregos Tabasco o Peligüey. Tesis Lic. FMVZ. UNAM.
29. Merck Co. Inc. (1981) El Manual Merck de Veterinaria. 2da. edición

Rahway N.J. U.S.A. págs. 1386.

30. Myers D. M., Jones H.L. and Varela Díaz V. (1972) Studies of Antigens for Complement Fixation and Gel Diffusion tests in the Diagnosis of Infections caused by Brucella ovis and other Brucella. Appl. Microbiol. 23: 894-902.
31. Myers D. M. (1973) Field Evaluation of The Gel Diffusion Tests for The Diagnosis of Rams Epididymitis caused by Brucella ovis. Appl. Microbiol. 26: 855-857.
32. Nilo N. (1984) Diagnosis of ovine Brucellosis. Can. Vet. J. 25: 118-119.
33. Pérez E., Flores R., De la Higuera y Trigo F.J. (1979) Diagnóstico y descripción de un brote de epididimitis ovina en México originado por Brucella ovis. Vet. Méx. 10: 221-226.
34. Pérez E. (1980) Estudio Epizootiológico de un brote de Brucella ovis en México. Tesis Lic. ENEP-C UNAM.
35. Pijoan P., Tórtora J. (1986) Principales enfermedades de los ovinos y caprinos Edit. Pijoan y Tórtora. págs. 405.
36. Rodríguez H. G. (1978) Epizootiología de la Brucelosis. Memorias del Foro Nacional sobre Brucelosis. INIP-ENEP. México D. F. págs. 10-39

37. S.A.R.H. Subsecretaría de Ganadería. Dirección General de Fomento Ganadero; Bases de la Producción ovina (1980) págs 10-23.
38. S.A.R.H. Subsecretaría de Ganadería. Dirección General de Fomento Ganadero: Compendio Histórico Estadístico del Sector Pecuario 1972-1983.
39. Smith and Jones (1972) Veterinary Pathology. fourth edition Lea and Febiger, Philadelphia. págs. 1521.
40. Suárez G. F., Flores C. R. (1978) Brucelosis en diferentes especies animales. Memorias del Foro Nacional sobre Brucelosis. INIP-ENEP. México D. F. págs. 40-46.
41. Williams Huw. (1984) Situación de la ovicultura a niveles mundial. Memorias del curso Bases de la cría ovina. Tol-Méx. Págs. 11-27.
42. Worthington R. W., Wendell and Penrose M. E. (1984) A comparison of three serological tests for the diagnosis of Brucella ovis infection in rams. N.Z. Vet. J. 32: 58-60.