

128
24

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**EVALUACION DE LA PRUEBA DE TARJETA PARA
EL DIAGNOSTICO DE LA BRUCELOSIS
OVINA (B. OVIS)**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
CARLOTA MARTINEZ AGUILERA**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**Asesores: Jesús Vázquez Navarrete
Rafael Colín Flores**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

C O N T E N I D O**P A G I N A****RESUMEN****1****INTRODUCCION****2****OBJETIVOS****7****MATERIAL Y METODOS****8****RESULTADOS****14****DISCUSION****18****CONCLUSIONES****20****LITERATURA CITADA****21**

RESUMEN

Carlota Martínez Aguilera. Evaluación de la prueba de tarjeta para el diagnóstico de la Brucelosis ovina (B. ovis) / (bajo la dirección de - Jesús Vázquez Navarrete y Rafael Colín Flores).

Para realizar la prueba de tarjeta, se obtuvieron un total de 400 sueros procedentes de dos centros ovinos, uno está ubicado en el municipio de Chapa de Mota (Centro Nacional de Investigación para Fomento - Ovino) y el segundo en Rfo Frío, Estado de México. A cada uno de los sueros obtenidos se les realizó las pruebas de tarjeta y Coombs usando un antígeno Brucelar amortiguado, preparado con la cepa 3572 de -- Brucella ovis.

Con la prueba de tarjeta se encontraron 73 sueros positivos de la dilución 1/10 a la 1/160, mientras que, en la prueba de Coombs se encontraron 88 sueros positivos hasta la dilución 1/360. La sensibilidad para la prueba de tarjeta fue de un 83.0% y la especificidad del --- 99.0%. Lo que indica que si se utiliza el antígeno específico de cepa rugosa de Brucella ovis la prueba de tarjeta resulta tener una buena sensibilidad para el diagnóstico de la Brucelosis ovina (B. ovis).

EVALUACION DE LA PRUEBA DE TARJETA PARA EL DIAGNOSTICO DE LA BRUCELOSIS OVINA (B. OVIS).

I N T R O D U C C I O N

Las infecciones causadas por Brucella s.p. usualmente son de curso cró
nico. Se encuentran muy distribuidas en todo el mundo afectando a --
los animales domésticos y al hombre (6, 11, 14).

Su amplia distribución geográfica y alta incidencia, hacen que esta en
fermedad cobre gran importancia (13, 14). La brucelosis causa en todo
el mundo problemas sanitarios y económicos, ya que esta puede ser ----
transmitida directa o indirectamente del animal al hombre, incluso de-
be considerarse no solo como causa de enfermedad, sino también como un
factor que afecta la producción de alimento proteico que es indispensa
ble para la salud y bienestar de las personas, ya que reduce los pará-
metros productivos, sin olvidar las pérdidas económicas que causa a
los productores de ovinos (27, 28).

Los ovinos han demostrado ser animales muy útiles al hombre, ya que sa
tisfacen una gran variedad de necesidades de este. Estos animales tie
nen un buen índice reproductivo, tamaño reducido y buena conversión --
alimenticia utilizando forrajes, además de que contribuyen en la ocupa
ción artesanal e industrial, y lo que es más importante proveen de ali
mento proteico al pueblo (32).

La epididimitis ovina fue diagnosticada por primera vez en Australia -
en 1953 por Simmons y Hall (4) estos autores le dieron al agente etio-
lógico el nombre de (B.L.O.) organismo semejante a la brucela. En el

mismo año fue diagnosticada por Buddle y Boyes (15) en Nueva Zelanda, - estos autores consideraban al agente causal como una cepa mutante de -- Brucella melitensis. Jebson como Hartley y col. (4) provocaron abortos en ovejas y lesiones de epidídimo en ovinos mediante inoculaciones experimentales de cultivos de organismo semejante a la brucela. En España Blasco y col. (4) basados en los resultados del estudio serológico de - algunos ovinos del Valle de Ebro, informan de la existencia de infec--- ción por Brucella ovis, donde se presentaban lesiones de epididimitis. Lo anterior fue confirmado mediante el aislamiento bacteriológico de di cho gérmen, a partir de semen de moruecos positivo a un antígeno de --- Brucella ovis. En 1965, Buddle (4) propuso la denominación de "Bruce-- lla ovis" como una especie y a la enfermedad que producía la denominó "Epididimitis infecciosa ovina".

ANTECEDENTES DE LA ENFERMEDAD EN MEXICO

Fue Martínez (20) en 1974 quien encontró por primera vez reactores posi--- tivos a Brucella ovis utilizando la prueba de fijación del complemento. En 1979 se aisló por primera vez el gérmen en un rebaño de raza Suffolk localizado en el Estado de Guanajuato, procedente de los Estados Unidos de Norte América (28).

En 1986 se detectó un brote en el centro ovino del programa de Exten--- sión Agropecuario de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia U.N.A.M. localizada en Topilejo, D.F. (19).

Características del agente infeccioso.

Brucella ovis es un cocobacilo Gram negativo pequeño, de aproximadamente 0.6 a 1.5 μ m de longitud. El crecimiento óptimo se da en cultivos - incubados con 10% de CO₂ a 37 C y sobre medios de cultivo enriquecidos con sangre o suero. Brucella ovis es oxidasa negativa, no utiliza el - iritol, no reduce los nitratos, no produce H₂S y no hidroliza la urea (7, 17, 24).

Características antigénicas.

Brucella ovis desde el punto de vista antigénico, es un gérmen que aparece siempre en fase rugosa estable y está desprovista de los antígenos de superficie característicos de Brucelas en su fase lisa como son B. abortus, B. melitensis, B. suis. En estudios sobre la relación antigénica entre especies rugosas (R) y lisas (S) de Brucela, se informó que las capas rugosas no poseen la endotoxina de tipo lipopolisacárido, asociado con la actividad aglutinogénica de las colonias lisas (12, 32) -- además se demostró que las colonias rugosas de Brucela poseen características antigénicas similares entre sí pero distintas a las cepas lisas (12, 21). Díaz y Bosseray (10) demostraron la presencia de antígenos conteniendo polisacáridos, en la superficie de brucelas rugosas, el cual forma líneas de precipitación solamente con sueros obtenidos después de la inmunización con brucelas en forma rugosa (R), pero no precipita con sueros preparados con brucelas en fase lisa (S). Estos resultados señalan que el antígeno de brucelas rugosas es específico para -- brucelas en fase rugosa (R).

D I A G N O S T I C O

Debido a que la epididimitis ovina puede deberse a diversas causas tales como infecciones causadas por Histophilus ovis, Actinobacillus seminis, Corynebacterium, pseudotuberculosis (ovis) o traumatismos (4, 33). Es necesario realizar el diagnóstico de la epididimitis ovina causada por Brucella ovis, mediante pruebas serológicas y bacteriológicas que confirmen la enfermedad (1, 18, 22, 24, 29), algunos autores (9, 16 23) mencionan que el diagnóstico serológico de la epididimitis ovina, puede realizarse utilizando antígenos elaborados con una cepa rugosa de Brucella canis, que presenta reacciones cruzadas con Brucella ovis. -- Por otro lado, en la actualidad muchos laboratorios realizan el diagnóstico de este padecimiento utilizando antígenos producidos con cepas lisas sin considerar que la epididimitis es causada por una cepa rugosa. Como ya se mencionó anteriormente el uso de antígenos de cepas lisas no detecta anticuerpos contra cepas rugosas (21, 29). Por lo anteriormente mencionado es importante estudiar con más detalle este tipo de antígenos de cepas rugosas que nos ayuden a obtener un diagnóstico eficaz de la brucelosis ovina.

Las pruebas serológicas usadas con más frecuencia para el diagnóstico de la brucelosis ovina, son:

- a) La fijación del complemento. Es la más utilizada en países ovejeros (21, 29, 30); sin embargo, tiene el inconveniente de requerir personal debidamente capacitado, material, reactivos y equipo adecuado (31, 34).

- b) La inmunodifusión en Gel. Es una prueba sencilla, el inconveniente de ésta es que es una prueba cualitativa, que requiere de por lo menos 24 hrs. de incubación (2, 5, 21).

- c) La prueba de Coombs, también llamada prueba de la antigamaglobulina, 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, además de ser cuantitativa (1, 3).

O B J E T I V O S

Obtener un método de diagnóstico sencillo y confiable para la epididimitis ovina causada por Brucella ovis.

- 1.- Elaborar un antígeno con cepa rugosa de Brucella ovis.
- 2.- Establecer la sensibilidad y especificidad de la prueba de tarjeta utilizando el antígeno antes mencionado considerando como prueba - de referencia a la prueba de Coombs.

H I P O T E S I S

Al utilizar el antígeno elaborado con cepa rugosa de Brucella ovis, en la prueba de tarjeta se espera obtener resultados similares a los de - la prueba de Coombs para el diagnóstico de la epididimitis ovina.

MATERIAL Y METODOS

Para realizar las pruebas se obtuvieron un total de 400 sueros procedentes de dos centros ovinos, uno ubicado en el municipio de Chapa de Mota (Centro Nacional de Investigación para Fomento Ovino) y el segundo en -- Río Frío, Estado de México. Se tomaron al azar 200 animales de cada -- centro, los cuales fueron sangrados por punción en la vena yugular, --- utilizando tubos vacutainer*, estos fueron transportados al laboratorio del Proyecto Enfermedades Bacterianas de los Ruminantes INIFAP - SARH, -- en Palo Alto, D.F. en donde se procedió a realizar las pruebas de tarje ta y Coombs a cada uno de los sueros obtenidos.

Los sueros controles positivos y negativos que se utilizaron en este -- trabajo fueron donados.**

Preparación del Antígeno Brucelar:

Para elaborar el antígeno, se preparó en cultivo con la cepa-3572 y se inocularon veinte botellas de roux utilizando para esto 3 ml. de suspensión bacteriana para cada una. Cada botella Roux contenía agar brucela con suero equino al 10%, estas se incubaron en una atmósfera de 10% de CO₂. El cultivo fue cosechado a las 96 hrs., agregando a cada botella

* Vacutainer Becton y Dickenson de México, S.A.

** Donados por el M.V.Z. Moisés Fraire C. de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM, así como del proyecto de enfermedades Bacterianas de los ruminantes INIFAP-SARH, en Palo Alto, D.F.

20 ml. de solución estéril amortiguada con fosfatos, inmediatamente después la suspensión fue inactivada a 95C en baño maría durante 60 min., el paquete brucelar fue recuperado por centrifugación a 5000 g. durante 60 min. a 4C. El antígeno fue teñido con 11 ml. de rosa de Bengala --- amortiguada a un pH de 3.65 y ajustado a un 8% de células por volumen (4). Para quitar el exceso de colorante el antígeno teñido se dejó reposar 24 hrs. a una temperatura de 4C y se volvió a centrifugar 2 veces consecutivas, y se suspendió en 75 ml. de S.S.E. amortiguada con fosfatos, y se le agregaron 0.5g de fenol, manteniéndolo en una membrana de diálisis para concentrar y purificar el antígeno durante 48 hrs. y en constante agitación magnética a una temperatura de 4C. El antígeno fue normalizado manteniéndolo en agitación magnética y posteriormente se -- filtró a través de algodón absorbente. La suspensión se mantiene nueva mente en agitación magnética durante dos horas, enseguida se extrajo la cantidad suficiente para determinar la densidad por método volumétrico de las células conglomeradas, la concentración final de la suspensión -- fue del 8% de células de Brucella ovis tal como se describe en la preparación del antígeno de Brucella abortus, con la cepa 1119-3, se ajustó el PH a 3.65 ± 0.05 y se probó con sueros controles positivos y negativos a Brucella ovis (3). El material antigénico fue envasado en 2 frascos de 25 ml. cada uno y se conservó a 4C quedando listo para ser utilizado.

Prueba de aglutinación de tarjeta (antígeno acidificado tamponado).

La prueba de tarjeta es una prueba rápida, sensible y específica.

Es de aglutinación macroscópica que se efectúa en una sola dilución y

que detecta principalmente anticuerpos o inmunoglobulinas G, esto se debe a que la acidez del antígeno inactiva a las inmunoglobulinas IgM --- (25).

Interpretación:

Se consideró una reacción positiva, cuando se presentaron aglutinaciones macroscópicas (grumos de tamaño moderado a grande).

Una reacción negativa presentó partículas dispersas sin los grumos característicos o ausencia de grumos.

PREPARACION DEL REACTIVO DE COOMBS (ANTIGLOBULINA)

El conejo es un animal idóneo para este propósito, excepto en el caso improbable de que se necesite globulina anticonejo.

Dos conejos de 2.5kg. de peso se inyectaron por vía intraperitoneal con 0.05ml. de suero de ovino diluido 1:1 con 0.5 ml. de solución salina esteril. A las 24 hrs. siguientes se le inyectaron en la vena marginal de la oreja 0.5ml. de suero diluido 1:1 con solución salina esteril. Durante 4 días siguientes se inyectó diariamente por vía intravenosa 1 ml. del suero. A los diez días después de la última inyección se sangraron los conejos y se tituló 1:100, quedando listo para su utilización. El reactivo de coombs preparado se conservó a -70C (1, 20).

TECNICA DE LA PRUEBA DE COOMBS

Para cada suero problema, se utilizaron series de 6 tubos, depositando en el primero tubo 0.8 ml. de solución salina (S.S) al 5% con 0.5% de fenol, del segundo al sexto tubo se depositaron 0.5 ml. del mismo diluyente. En seguida con una micropipeta se depositaron 0.2 ml. del suero problema al primer tubo, de ahí se transfirieron 0.5 ml. de la mezcla - al 2° tubo y así sucesivamente hasta llegar al 6°, eliminando al final la misma cantidad quedando así toda la serie de tubos con un volumen de 1ml. de esta manera las diluciones finales del suero fueron: 1:10, 1:20 1:40, 1:80, 1:160, 1:360. Posteriormente con una jeringa automática se depositaron en todos los tubos 0.5ml. de antígeno de Brucella ovis, --- quedando un volumen final de 1ml. Los tubos se incubaron a 37C durante 24-48 horas, después los tubos con la mezcla antígeno-suero se centrifugaron 3 veces a 1000g. durante 20 minutos a 4C, suspendiendo en cada -- ocasión el sedimento de la mezcla con 2ml. de solución salina normal - (S.S.N.) en la última centrifugación se desechó el sobrenadante teniendo el cuidado de no eliminar el sedimento y se resuspendió con el reactivo de Coombs diluido 1:100 en solución salina normal, los tubos se colocaron en la incubadora durante 24 hrs. y después se procedió a leer - los resultados tal y como se hace en una prueba ordinaria de aglutinación en tubo (3).

Interpretación

Se tomaron las series de 6 tubos de cada muestra y mediante una leve -- agitación fueron examinados uno por uno considerando positivos a aquellos que presentaron aglutinación franca a partir de la dilución 1:100 (3).

ANALISIS ESTADISTICO

A cada uno de los 400 sueros antes mencionados se les realizaron las -- pruebas de tarjeta y Coombs, registrándose el resultado de la prueba -- como positivo o negativo, con esta información se obtuvo la sensibili-- dad y especificidad de la tarjeta, para detectar anticuerpos contra --- Brucella ovis, considerando como referencia a la prueba de Coombs.

$$\text{SENSIBILIDAD} = \frac{\text{Sueros positivos en ambas pruebas}}{\text{Sueros positivos a la prueba de Coombs}}$$

Esta expresión sirvió para obtener la sensibilidad relativa para cada -- una de las diluciones empleadas y para obtener la sensibilidad total.

$$\text{ESPECIFICIDAD} = \frac{\text{Sueros negativos en ambas pruebas}}{\text{Sueros negativos a la prueba de Coombs}}$$

Para determinar si la pérdida de sensibilidad de la prueba de tarjeta -- tiene un efecto significativo se utilizó la prueba de Ji cuadrada (χ^2).

R E S U L T A D O S

De los 400 sueros analizados se encontraron 73 positivos con la prueba de tarjeta, y 88 con la prueba de Coombs. La sensibilidad de la prueba de tarjeta fue de 83.0%, sin embargo en la sensibilidad relativa se encontraron valores diferentes de acuerdo a la dilución, estos resultados se presentan en el cuadro no. 1 donde se puede observar que la prueba de tarjeta solo detectó casos positivos hasta la dilución 1/320. En la figura no. 1 se presenta la sensibilidad en relación a la dilución del suero. En la figura no. 2 se señala la sensibilidad acumulada y se observa que la prueba de tarjeta detectó antígenos contra Brucella ovis sólo hasta la dilución 1/80 de la prueba de Coombs, lo que representa una sensibilidad del 83.0% mientras que la de Coombs mantuvo su sensibilidad hasta la dilución 1/320. Dando una sensibilidad acumulada del 100%. Por lo anterior, puede señalarse que la prueba de tarjeta tiene una pérdida de sensibilidad del 17.0%. Mediante la prueba de Ji cuadrada (χ^2) se pudo comprobar que la pérdida de sensibilidad es altamente significativa ($P < .01$), lo que sugiere diferencias en sensibilidad entre la prueba de Coombs y tarjeta.

Se encontró que la especificidad en la prueba de tarjeta es de un 99.0%

CUADRO 1

SENSIBILIDAD RELATIVA Y ACUMULADA DE LA PRUEBA DE TARJETA EN RELACION A LA DE COOMBS

DILUCION	<u>PRUEBA DE TARJETA</u>			<u>PRUEBA DE COOMBS</u>		
	N.S.P.*	SENSIBILIDAD RELATIVA (%)	SENSIBILIDAD ACUMULADA (%)	N.S.P.*	SENSIBILIDAD RELATIVA (%)	SENSIBILIDAD ACUMULADA (%)
1/10	8	9.1	9.1	8	9.1	9.10
1/20	24	27.7	36.37	24	27.27	36.37
1/40	24	27.7	63.64	24	27.27	63.64
1/80	9	10.23	73.87	9	10.23	73.87
1/160	8	9.10	82.97	17	19.32	93.18
1/320	0	0	82.97	6	6.82	100.0

TOTAL: 2388

*N.S.P.= número de sueros positivos

FIGURA 1.

Sensibilidad a *Brucella ovis* de acuerdo a la Dilución para las pruebas de
TARJETA Y COOMBS.

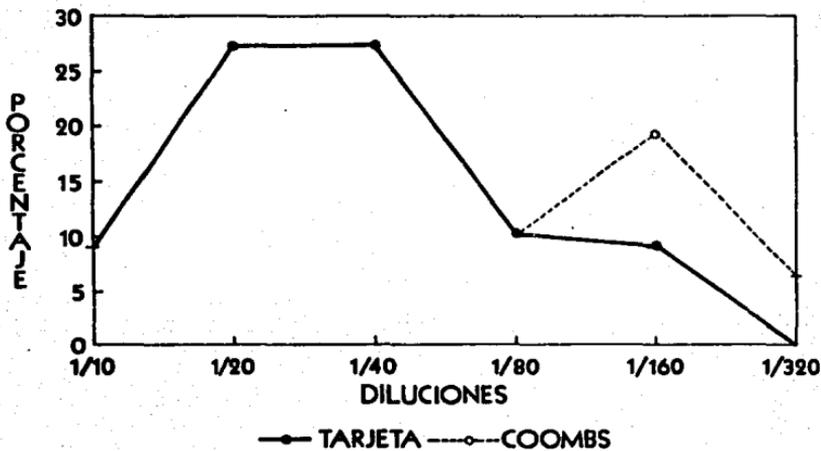
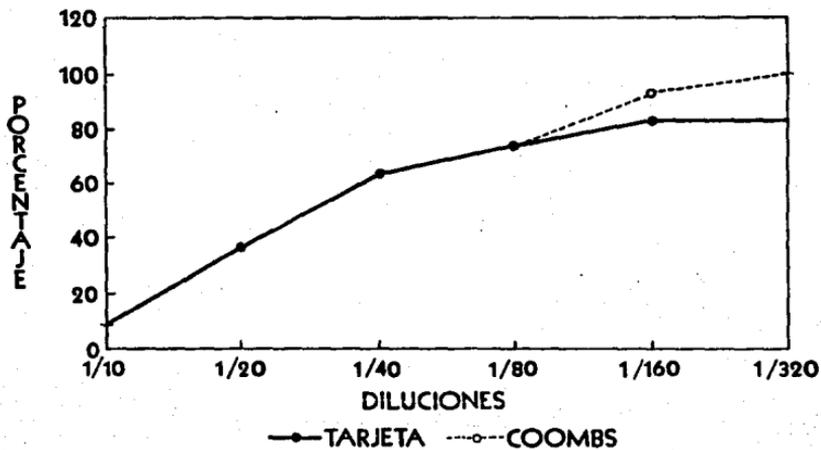


FIGURA 2.

Sensibilidad Acumulada a *Brucella ovis* para las pruebas de
TARJETA Y COOMBS.



DISCUSION

En la brucelosis ovina se han utilizado una gran variedad de técnicas - encaminadas a detectar la presencia de anticuerpos contra Brucella ovis. Algunas de estas técnicas como la inmunodifusión radial que son de tipo cualitativo han demostrado tener una sensibilidad de 92.3% y una elevada especificidad (23). Sin embargo, tienen la característica de que -- son pruebas que se realizan con antígenos solubles del tipo de los poli sacáridos (32). Cho y Niilo (8) en el trabajo que realizaron en 1986 - encontraron que la prueba de Enzima conjugada con inunosorbentes ---- (ELISA) presentó una especificidad del 99.4% y un 96.0% para la prueba de fijación de complemento. También encontraron que la prueba de ELISA tiene una sensibilidad del 100% y la de fijación de complemento de un 97.5% (8). Por lo tanto las pruebas son altamente sensibles y específicas para el diagnóstico de la brucelosis ovina, sólo que tienen el inconveniente de requerir reactivos costosos y personal altamente calificado.

En el quinto informe de Expertos en Brucelosis FAO/OMS se menciona que la prueba de Coombs es altamente específica, pero permite sólo descubrir algo más de 70.0% de animales infectados (13).

En este trabajo se encontró que al comparar la prueba de tarjeta con la de de Coombs utilizando el antígeno rugoso de Brucella ovis teñido con Rosa de Bengala, se obtuvo para la prueba de tarjeta una sensibilidad - del 83.0% y una especificidad del 99.0% en los sueros de las dos explotaciones de ovinos estudiadas. Por lo que se puede apreciar estos re-

sultados son similares a los obtenidos por los autores en las pruebas -- antes mencionadas (26).

Se menciona que con frecuencia el antígeno de tarjeta elaborado con cepas rugosas como: Brucella ovis y Brucella canis se aglutinan, sin embargo durante la elaboración del antígeno de Brucella ovis, observamos que juega un papel muy importante el preparar con mucho cuidado las soluciones amortiguadas en fosfato, así como el tener un P.H de 3.65 (3). para evitar que estos autoaglutinen (4).

La utilización de los antígenos celulares completos, pueden originar -- reacciones cruzadas de Brucella ovis con cepas rugosas (12), siendo menor el que cruce con las cepas lisas de brucela (11).

La prueba de tarjeta tiene las ventajas con relación a otras pruebas, -- de ser rápida, altamente sensible y con una buena especificidad. Para su realización no se requiere de personal altamente capacitado y por -- otro lado, ofrece la posibilidad de utilizarla en condiciones de campo y en cualquier laboratorio dotado de un mínimo de equipo.

Se considera importante seguir estudiando antígenos completos de cepas rugosas, para poder tener así un panorama más amplio en el diagnóstico de la expididimitis ovina, ya que en la actualidad la mayoría de las -- pruebas se realizan con cepas lisas, sin considerar que estas no dan -- una reacción cruzada.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CONCLUSIONES

1. El antígeno para la prueba de tarjeta de Brucella ovis, teñido con Rosa de Bengala y amortiguada a un P.H. de 3.65 y a una concentración del 8.0% de células por volumen, demostró ser útil al ponerlo en contacto con los sueros controles positivos antes mencionados, de animales infectados con Brucella ovis.
- 2.- Se encontró que la prueba de tarjeta detectó anticuerpos contra Brucella ovis hasta la dilución 1/80. Esto nos indicó una sensibilidad del 83.0%.
- 3.- La especificidad que se encontró para la prueba de tarjeta fue del 99.0% similar a la prueba de Coombs.
- 4.- Al utilizar el antígeno específico de cepa rugosa de Brucella ovis. Se observó una buena sensibilidad y especificidad en la prueba de tarjeta.

LITERATURA CITADA

- 1.- Acharya, B. N. and Panda, S. A.: Role of blocking antibody and Coombs antiglobulin test in the detection of Brucellosis in Sheep. Indian J. anim. Health 24: 123-136 (1985).
- 2.- Ajai, C.O.: Cook, J.E. and Dennis, S. M.: Diagnosing ovine epididymitis by immunofluorescence. Vet. Rec. 107: 421-424 (1980).
- 3.- Alton, G. G., Jones, L. M. and Pietz, D.E.: Laboratory techniques in Brucellosis, 2nd. ed WHO, Geneva, 1975.
- 4.- Blasco, M. J. Ma.: La Epididimitis Contagiosa del morueco (Infección por Brucella ovis) Revisión Bibliográfica Departamento de -- Producción animal, Pastos y Forrajes C.R.I.D.A. Zaragoza 9-22 -- (1983).
- 5.- Boix, S.A.A.: "Determinación de la incidencia de Brucella ovis en hembras de un rebaño ovino con antecedentes de apididimitis en un semental" Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Izcalli, Estado de México (1987).
- 6.- Brown, G. M., Pietz, D. E. and Price, D. A.: Studies on the transmission of Brucella ovis infection in rams. Cornell Vet. 63: 29-40 (1973).
- 7.- Brown, G. M. Ranger, C. R. and Kelley, D. J.: Selective media for the isolation of Brucella ovis. Cornell Vet. 61: 265-279 (1970).
- 8.- Cho, H. J. and Nillo, L.: Diagnostic sensitivity and Specificity of an Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the Diagnosis of Brucella ovis. Infection Rams. Can. J. Vet. Res. 51: 99-103 (1987)

9. Corbel, M. J., Thomas, E.L.: Use of Phage for the identification of Brucella canis and Brucella ovis cultures. Rec. Vet. Sci., 38: 35-40 (1985).
10. Díaz, R., y Basseray. N.: Identificación d' um cimposé antigeniqué spécifique de la phase rugueuse (R) des Brucella, Ann. Rech. Vet.; 4: 283-292 (1973).
11. Díaz, R., Jones, M.L. and Wilson, J.B.: Antigenic Relationship of Brucella ovis and Brucella melitensis. J. of Bacteriol. 93: 1262-1268 (1967).
12. Díaz, R., Jones, M.L. and Wilson, J.B.: Antigenic Relationship of the gram-negative organism causing canine abortion to smooth and rough Brucella. J. Bacteriol. 95: 618-624 (1968).
13. FAO/OMS; Comité Mixto de Expertos en Brucelosis, Quinto Informe, Serie de Informes Técnicos 464: (1971).
14. Flores, C.R. and Bear, G.M.: Brucellosis (B. melitensis). Zoonotic Implications in: CRC-Handbook series in zoonoses, 1st. ed. Steele, H., ed., C.R.C. Press, Florida, 195 (1979).
15. Hughes, K.L., and Claxton P.D.: Brucella ovis infection I. an - Evaluation of microbiological, Serological and clinical Methods of Diagnosis in the Ram. Aus. Vet. J. 44: 4147 (1968).
16. Jones. L. Zanardi, M., Leong, D. and Wilson.: Taxonomic Position in the Genus Brucella, of the Causative Agent of The Canine Abortion. J. of Bacteriol. 95: 625-630 (1980).

17. Krieg, N.R.: Bergey's manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1. Ed. Williams and Wilkins Baltimore London 1984.
18. Lozano, E.A.: Etiologic significance of bacterial isolates from rams with palpable epididymitis. Am. J. Vet. Res. 47: 1153-1156 (1986).
19. Lucio, A.M.: Lesiones Histopatológicas en epidídimo y testículos de carneros en un brote de Brucelosis en el Centro ovino del Programa de Extensión Agropecuario. Tesis de Licenciatura. Fac. de Méd. Vet. Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. (1986)
20. Martínez, Y.E.: Presencia de anticuerpos contra Brucella ovis y Brucella melitensis en sueros de borregos tabasco o pelibuey. Tesis de Licenciatura Fac. de Med. Vet. y Zoot., Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 1974.
21. Myers, D.M.: Jones, L.M. and Varela Díaz, V.M.: Studies of antigens for complement fixation and gel diffusion test in the diagnosis of infections caused by Brucella ovis and other Brucellae Appl. Microbiol. 23: 894-902, (1972).
22. Myers, D.M. and Siniuk, A.A.: Preliminary Report on the Development of a Diffusion- in- Gel Method for the Diagnosis of Ram Epididymitis. Appl. Microbiol. 19: 335-337, (1970).
23. Myers, D.M. Varela-Díaz V.M.: and Coltorti E.A.: Comparative - Sensitivity of Gel-diffusion and tube agglutination test for the detection of Brucella canis antibodies in experimentally infected dogs. Appl. Microbiol. 28: 1-4 (1974).

24. Myers., M.E.: The Epizootiology of Brucellosis and its Relationship to the Identification of Brucella organisms. Am. J. Vet. Res. 25: 553-557 (1975).
25. Morilla A.G. y Bautista G.C.R.: Manual de Inmunología la Ed. Diana, S.A., México, D.F. 1986.
26. Navarro, F.R.; Introducción a la Bioestadística. Análisis y Variables Binarias. la. Ed., MC. Graw Hill, México, México, D.F., 1988.
27. Pérez, D.E.; Estudio epizootiológico de un brote de Brucella ovis en México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 1980.
28. Pérez, E., Flores, C.R., de la Higuera, J.A. y Trigo, T.F.J.: Diagnóstico y descripción de un brote de epididimitis ovina en México originado por Brucella ovis. Vet. Méx. 10: 221-226 (1979).
29. Rothwell, J.T. Searson, J.E., Links, I.J. and Glastonbury, J.R.W.: Examination of rams culled during an ovine brucellosis accredited - free flock Scheme. Aust. Vet. J. 63: 209-211 (1968).
30. Sarvamangala J.N. Davi, S.S., Polt, F.N. Docter J.B. Peter: Serological Evaluation of Brucellosis: Importance of Species in Antigen preparation J. of infections Disease. 156: 658-661 (1987).
31. Searson, J.E.: Distribution of Brucella ovis in the tissues of - rams reacting in a complement fixation test for ovine brucellosis. Aust. Vet. J. 63: 30-31 (1986).

32. Sgárez, G.F. y Castro, F.R.: Brucelosis en diferentes especies animales. Memorias del foro Nacional sobre brucelosis. México, D.F. 1978 40-44.
Talleres gráficos de guadarrama impresores, S.A. México 13 D.F. (1978).
33. Walker, R.L., Lea Master B.L., Biberstein E.L. Stellflug J.N.: - Serodiagnosis of Histophilus ovis-associated epididymitis in rams. Am. J. Vet. Res. 49: 208-212 (1988).
34. Webb, P.F., Quinn, C.A., Cockram, F.A. and Husband, A.J.: Evaluation of procedures for the diagnosis of Brucella ovis infection. N. Z. Vet. J. 26: 133-134 (1980).