

ISPITIVANJE PRISUSTVA INFEKCIJE SA *BRUCELLA OVIS* (OVINE EPIDIDIMITIS) KOD OVACA

Živoslav Grgić¹, Branka Vidić, Sara Savić, Aleksandar Milovanović
Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”, Novi Sad

Kratak sažetak

Brucella ovis izaziva klinički manifestnu formu bolesti koja se naziva epididimitis ovnova. Uzročnik je gramnegativni kokobacil ili kratki štapić, fakultativni intracelularni patogen. Bolest karakterišu genitalne lezije koje se manifestuju u formi epididimitisa i placentitisa kod ovaca, a često infekcija protiče u subkliničkom obliku. Posledice ovog oboljenja su smanjena plodnost kod ovnova, česti abortus kod ovaca, i povećan perinatalni mortalitet. Infekcija se u zapaht najčešće unosi preko inficiranih ovnova, koji semenom izlučuju veliki broj brucela, dok je pasivna genitalna transmisija uobičajen način inficiranja. *B. ovis* izazva upalu pasemenika, semenika i utiče na fertilitnost ovnova, dok kod ovaca može uzrokovati abortus i placentitis. Ovnovi su mnogo prijemčiviji za infekciju od ovaca, a bolest se češće javlja kod starijih grla. Dijagnoza na osnovu kliničke indikacije za brucelozni epididimitis nije dovoljno pouzdana, pa se za dokazivanje infekcije sa *B. ovis* uzimaju uzorci semena, vaginalni brisevi, mleko i razmazi suspektnog tkiva koji se boje i ispituju metodom mikroskopije i kultivacijom na selektivnim hranljivim podlogama. Našim ispitivanjima obuhvaćene su ovce i ovnovi iz svih opština Južnobačkog i Sremskog okruga, kao i odabrani uzorak ovnova iz Srednjobanatskog epizootiološkog područja. Ispitivanjem su obuhvaćeni i ovnovi kod kojih su postojale kliničke indikacije za epididimitis, koje je konstatovala služba NIV-NS. Pregledano je 1500 uzoraka seruma ovaca i ovnova metodom reakciju vezivanja komplemenata (mikro-RVK). Nalaz specifičnih antitela protiv *B. ovis* u razblaženju seruma 1:5 i većem, dijagnostikovao je kao pozitivan. Nalaz specifičnih antitela protiv *B. ovis* utvrđen je kod ovaca koje potiču iz opštine Bečej i Titel na epizootiološkom području Južnobačkog okruga. Prevalenca je bila veoma niska i iznosila je 0,89%. Na epizootiološkom području Srednjobanatskog okruga, gde su ispitivani samo ovnovi, dijagnostikovao je nešto viši nivo prevalencije za *B. ovis* (4,29%), dok na epizootiološkom području Sremskog okruga nisu dijagnostikovana seropozitivna grla na *B. ovis*. Takođe je usta-

1 E-mail: grgic@niv.ns.ac.rs

novljeno da pregledani ovnovi sa kliničkim simptomima epididimitisa nisu bili seropozitivni na *B. ovis*.

Ključne reči: ovce, *B. ovis*, epididimitis

EXAMINATION OF *BRUCELLA OVIS* (OVINE EPIDIDIMYTIS) INFECTION IN SHEEP

Živoslav Grgić, Branka Vidić, Sara Savić, Aleksandar Milovanović
Scientific Veterinary Institute „Novi Sad”, Rumenački put 20, Novi Sad

Abstract

Brucella ovis is caused by clinically manifested disease named ram epididymitis. The causative agent is a gram-negative coccobacillus or short rod, facultative intracellular pathogen. The disease is characterized by genital lesions manifested in a form of epididymitis and placentitis in sheep, but the infection may also be subclinical. The consequences of this disease are reduced fertility in rams, frequent abortions in sheep and increased perinatal mortality. Most often the infection enters into a flock through infected rams, that shed great number of *Brucella*, however passive genital transmission is the usual way of infection. *B. ovis* causes inflammation of epididymis, semen and influences the fertility of rams, but in sheep it causes abortion and placentitis. Rams are more susceptible than sheep, and the disease affects adult animals. The diagnosis based only on clinical identification most often is not sufficiently reliable, so the samples of semen, vaginal swab, milk and the smears of susceptible tissues are taken and then stained, microscopically examined and cultivated on nutritive agar. Our examination encompassed sheep and rams from the municipalities in Southern Bačka and Srem district, as well as the samples from Middle Banat. The examination included also the rams with clinical symptoms of epididymitis, what had been proven by NIV-NS. There were 1500 sera samples from sheep and rams examined by the method of complement fixation (MCF). The findings of specific antibodies against *B. ovis* in dilution 1:5 was considered positive. Specific antibodies against *B. ovis* were detected in the sheep that originated from Bečej and Titel municipality, Southern Bačka district. The prevalence was very low and was 0.89%. In Middle Banat district, where only rams were examined, a higher prevalence was diagnosed for *B. ovis* (4.29%), but in Srem district no animals were seropositive on *B. ovis*. The

examined rams with clinical symptoms of epididymitis were not seropositive on *B. ovis*.

Key words: sheep, *B. ovis*, epididymitis

UVOD

Brucella ovis izaziva klinički manifestnu formu bolesti koja se naziva epididimitis ovnova. Uzročnik je gram negativni kokobacil ili kratki štapić, fakultativni intracelularni patogen. Bolest karakterišu genitalne lezije koje se manifestuju u formi epididimitisa i placentitisa kod ovaca, a često infekcija protiče u subkliničkom obliku. Shodno tome, posledice bolesti su smanjena plodnost kod ovnova, česti abortus kod ovaca, i povećan perinatalni mortalitet. Infekcija je dokazana u većini zemalja gde se gaje ovce. Bolest je prisutna u Argentini, Australiji, Austriji, Kanadi, Francuskoj, Nemačkoj, Mađarskoj, Meksiku, Novom Zelandu, Peruu, Rumuniji, Bugarskoj, Rusiji, Slovačkoj Republici, Južnoj Africi, Španiji, SAD (Blasko i sar., 1990).

Infekcija *B. ovis* u prirodnim uslovima dokazana je samo kod jelena, dok su u eksperimentalnim uslovima goveda i koze prijemčive za *B. ovis*. Do danas ne postoje izveštaji o slučajevima infekcije kod ljudi i smatra se da *B. ovis* nije zoonoza (Blasko i sar., 1990).

Infekcija se u zapat najčešće unosi preko inficiranih ovnova, koji semenom izlučuju veliki broj brucela, dok je pasivna genitalna transmisija uobičajen način inficiranja (Buling i Andersom, 1983). Ovnovi su mnogo prijemčiviji za infekciju od ovaca, a bolest se češće javlja kod starijih grla. Većina ovnova aktivno izlučuje brucele semenom tokom 2 do 4 godine ili duže (Burgess i Mcowell, 1981). Ovce su mnogo otpornije na infekciju i kraće izlučuju brucele vaginalnim iscetkom i mlekom, kada su infekciji izložena i jagnjad. Prenos sa ovna na ovna nije razjašnjen i može se ostvariti na razne načine uključujući i oralnu transmisiju. Inficirane životinje mogu izlučivati uzročnika i putem urina. Kontaminacija pašnjaka nije značajan put transmisije *B. ovis* (Burgess i Mcowell, 1981).

B. ovis može izazvati upalu pasemenika, semenika i uticati na fertilitet kod ovnova. *B. ovis* takođe može uzrokovati abortus i placentitis kod ovaca, ali se to ne dešava često. Sistemske promene su retke kod odraslih ovaca i ovnova. Procenat nivoa abortusa kod ovaca i perinatalni mortalitet je nizak i varira od 1 i 2%, a eksperimentalnim zaražavanjem do 8%. Dokaz postojanja genitalnih lezija, unilateralni ili, ređe bilateralni epididimitis utvrđuje se palpacijom testisa ovnova što može da bude indikacija prisutva ove infekcije u stadu. Međutim, dijagnoza na osnovu kliničkih znakova nije dovoljno pouzdana, pa se za dokazivanje infekcije sa *B. ovis* uzimaju uzorci semena, vaginalni brisevi, mleko i razmazi suspektnog tkiva koji se boje i ispituju metodom mikroskopije i kultivacijom na selektivnim hranljivim podlogama. Razvoj molekularnih metoda, kao što je PCR metod omogućava efikasniju etiološku dijagnozu (Bricker, 1971; Materola, 2003). Indirektna dijagnoza je zasnovana na serološkim testovima i više se koristi u rutinskoj dijagnostici. Od seroloških testova

koriste se test vezivanja komplementa (RVK) (Burgess i Norris, 1982; Corbel i sar., 1978), agar gel imunodifuzija (AGID) i ELISA test (Ris i sar., 1984).

MATERIJAL I METOD

Životinje: ispitivanjem su obuhvaćene ovce i ovnovi iz svih opština Južnobačkog i Sremskog okruga, na osnovu odabranog uzorka, kao i ovnovi iz Srednjobanatskog okruga.

Ispitivanjem su obuhvaćeni i ovnovi kod kojih su postojale kliničke indikacije za epididimitis, koje je konstatovala služba NIV-NS.

Krvni serum: Ispitivanjima je obuhvaćeno 1500 uzoraka seruma ovaca prikupljenih tokom sprovođenja Programa mera za 2005. godinu. Za ispitivanje prisustva specifičnih antitela koristili smo reakciju vezivanja komplementa (mikro-RVK). Nalaz specifičnih antitela u razblaženju seruma 1:5 i većem smatran je pozitivnim.

REZULTATI I DISKUSIJA

Tokom ispitivanja ustanovljeni cf rezultati prikazani su u tabelama 1, 2. i 3. Na Južnobačkom epizootiološkom području primenom RVK ispitano je 779 uzoraka seruma ovaca od ukupno 47790 seruma ovaca koji su ispitani na brucelozu prema Programu mera za 2005. godinu. Pozitivni nalazi dobijeni su kod 7 uzorka seruma. Pozitivni nalazi utvrđeni su kod ovaca koje potiču iz opštine Bečej i Titel. Prevalencija infekcije ovaca sa *B. ovis* na Južnobačkom epizootiološkom području je iznosila P= 0,89% (tabela 1).

Tabela 1. Nalaz RVK antitela za *B. ovis* u krvnom serumu ovaca na Južnobačkom epizootiološkom području

Opština	Broj ovaca u opštini	Broj ispitanih uzoraka	% ispitanih uzoraka seruma u odnosu na br. ovaca	Br. pozitivnih u odnosu na br. ispitanih	Stepen prevalencije ispitane populacije ovaca
Bač	5104	83	1,62	-	-
Bačka Palanka	8832	145	1,64	-	-
Bački Petrovac	203	4	1,94	-	-
Bečej	11411	187	1,63	5	2,67
Novi Sad	8453	137	1,62	-	-
Srbobran	3147	50	1,58	-	-
Temerin	1273	22	1,72	-	-
Titel	4309	70	1,62	2	2,87
Žabalj	5058	81	1,60	-	-
Ukupno	47790	779	1,63	7	0,89

U krvnim serumima (651) ovaca koje potiču iz sremskog epizootiološkog područja (populaciji od 41187 životinja) dobijeni su negativni nalazi na prisustvo *B. ovis* (tabela 2).

Analizirajući epizootiološka područja Južnobačkog i Sremskog okruga sa ukupno 88977 životinja, dobijeni su rezultati prevalencije na infekciju ovaca sa *B. ovis* od $P=0,49$. U okviru navedenih ispitivanja uključeni su i krvni serumi 70 ovnova sa Srednjobanatskog epizootiološkog područja, gde smo ispitivanjem ustanovili 3 pozitivne životinje. Na osnovu svih izvršenih ispitivanja uzoraka seruma ovaca utvrđeno je 10, odnosno 0,66%, pozitivnih životinja na *B. ovis* (tabela 3).

Tabela 2. Nalaz RVK antitela protiv *B. ovis* u krvnom serumu ovaca na području Sremskog okruga

Opština	Broj ovaca u opštini	Broj ispitanih uzoraka	% ispitanih uzoraka seruma u odnosu na br. ovaca	Br. pozitivnih u odnosu na br. ispitanih	Stepen prevalencije ispitane populacije ovaca
Beočin	2456	38	1,54	-	-
Indija	5880	93	1,58	-	-
Irig	2927	45	1,53	-	-
Pečinci	3936	61	1,54	-	-
Ruma	4934	78	1,58	-	-
Sr. Karlovci	731	13	1,77	-	-
Sr. Mitrovica	10007	159	1,58	-	-
St. Pazova	4069	65	1,59	-	-
Šid	6247	99	1,58	-	-
Ukupno	41187	651	1,58	-	-

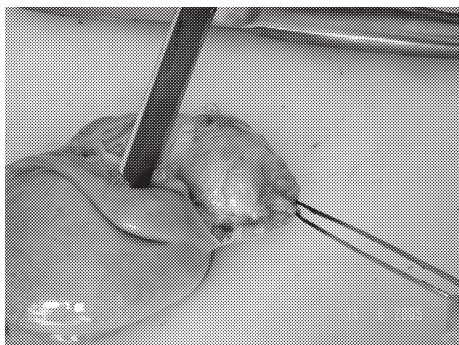
Tabela 3. - Zbirni rezultati ispitivanja krvi ovaca na *B. ovis*

Epizootiološko područje	Ukupan br. ovaca u epizootiološkom području	Broj ispitanih uzoraka	% ispitanih uzoraka seruma u odnosu na br. ovaca	Br. pozitivnih u odnosu na br. ispitanih	Stepen prevalencije ispitane populacije ovaca
Južna Bačka	47790	779	1,63	7	P = 0,89
Srem	41187	651	1,58	-	-
Južna Bačka i Srem	88977	1430	1,61	7	P = 0,49
Srednji Banat	13287	70*	0,52	3	P = 4,29
Ukupno	102264	1500	1,46	10	P = 0,66

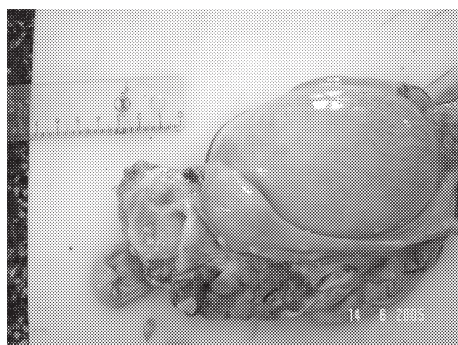
*Uzorci seruma ovnova

Potrebno je istaći da su uzorci seruma kod kojih je dobijen pozitivan i sumnjiv nalaz na *B. ovis*, ispitani i na *B. melitensis* i da je dobijen negativan nalaz. U okviru ispitanih uzoraka nalazili su se i krvni serumi 7 ovnova koji su imali kliničke

indikacije za brucelozni epididimitis, ali je serološki nalaz bio negativan. Bakteriološkim ispitivanjem gnojnih apscesa (slika 1 i 2) i prepucijalnog sadržaja ovnova sa genitalnim lezijama nije izolovana patogena mikroflora.



Slika 1. Gnojni apsces na epididimisu



Slika 2. Gnojni apsces na epididimisu

Kod svih genitalnih lezija ovnova potrebno je postaviti osnovanu sumnju na mogući epididimitis uzrokovan *B. ovis*-om. Međutim, lezije koje se mogu palpirati ne moraju biti nađene kod svih inficiranih ovnova, pa je neophodno izvršiti i laboratorijska ispitivanja. Mnoge lezije na epididimisu ustanovljene palpacijom kod ovnova su često sterilni granulomi izazvani traumom. Sumnju da je infekcija prisutna pobuđuje loš kvalitet semena u kome je prisutan veliki broj leukocita. Postojanje kliničkih lezija kod ovnova može biti indikacija o postojanju infekcije, ali da bi se potvrdila bolest neophodno je laboratorijsko ispitivanje. U ranoj fazi oboljenja se može konstatovati samo slab kvalitet semena, koji se ispoljava u vidu smanjene pokretljivosti, broja i anomalija u izgledu spermatozoida. U poodmakloj fazi oboljenja mogu se palpirati lezije na epididimisu i skrotumu. Epididimitis može biti unilateralan ili povremeno bilateralan. Testisi mogu atrofirati. Lezije koje se mogu palpirati su uglavnom trajne, a u nekim slučajevima mogu biti prolazne. Oko 30 do 50% svih inficiranih ovnova ima lezije na epididimisu koje se mogu palpirati. Kod nekih ovnova su opisani slučajevi izlučivanja *B. ovis* bez klinički vidljivih lezija. Međutim, ova klinička dijagnoza nije dovoljno osetljiva jer je epididimitis prisutan kod oko 50% ovnova inficiranih *B. ovis*-om (Blasko, 1990). Takođe, klinička dijagnoza je nespecifična i zbog postojanja mnogih drugih bakterija koje izazivaju klinički epididimitis (*Actinobacillus seminis*, *A. actinomycetemocomitans*, *Histophilus ovis*, *Haemophilus spp.*, *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis*, *B. melitensis* i *Chlamydophila abortus*). *B. ovis* nema zoonozni karakter, međutim na područjima gde *B. ovis* koegzistira sa *B. melitensis* potrebna je posebna pažnja prilikom uzorkovanja, rukovanja i slanja uzoraka, jer je *B. melitensis* visoko patogena za ljude. Za dokazivanje infekcije *B. ovis*-om uzimaju se uzorci semena, vaginalni brisevi, mleko i razmazi suspektnog tkiva koji se mogu obojiti i ispitati mikroskopijom. *B. ovis* se može izolovati iz uzoraka semena od živih ovnova i iz vaginalnih briseva kao i

mleka ovaca. Neophodno je dvokratno uzorkovanje semena jer se *B. ovis* izlučuje povremeno (intermitentno). Pri sekciji kod ovnova sa kliničkim znacima koji ukazuju na infekciju *B. ovis*-om najbolje je uzeti uzorak dela pasemenika, seminalne kesice i ingvinalnih limfnih čvorova. Kod ovaca se uzorkuje uterusni, ilijačni i supramamarni limfni čvorovi. Kod abortiranih ili mrtvorodenih jagnjadi za kultivaciju su najpogodniji abomazusni sadržaj i pluća.

Laboratorijska potvrda može da se bazira na direktnim i indirektnim metodima. Mikroskopski pregled semena ili preparati obojeni po *Stamp*-u mogu biti korisni za postavljanje sumnje na infekciju. Brucele su kokobacili ili kratki štapići obično postavljeni pojedinačno ili ponekada u paru ili manjim grupama. Ovaj test nije definitivan jer i drugi agensi, kao što su *Chlamydophila abortus* i *Coxiella burnetii*, mogu ličiti na brucele. Direktna dijagnoza se vrši bakteriološkim metodima, izolacijom *B. ovis* iz uzoraka semena, tkiva, vaginalnog iscetka i mleka ovaca, na adekvatnim selektivnim podlogama (Worthington i sar., 1985). *Brucella spp.* se može izolovati na mnogim jednostavnim ili selektivnim podlogama poput *Farrel*-ove podloge ili *Thayer-Martin*-ove modifikovane podloge (Marin i sar, 1996). Tehnike obogaćenja se takođe mogu koristiti. Kolonije *B. ovis* obično postaju vidljive posle tri do četiri dana. Kolonije su okrugle, sjajne i konveksne oko 0,5 do 2,5 mm u dijametru. *B. ovis* je hrapava forma *Brucella* što se može videti ukoliko se kolonija posmatra preko ukošene iluminacije. *B. ovis* se identifikuje do nivoa vrste preko kulturelnih, biohemijskih i seroloških karakteristika, a fagotipizacijom se može izvršiti definitivna identifikacija. Razvoj molekularnih metoda, kao što je *PCR* metod omogućava efikasniju etiološku dijagnozu (Bricker, 2002). Indirektna dijagnoza je zasnovana na serološkim testovima i više se koristi u rutinskoj dijagnostici. Od seroloških testova koriste se test vezivanja komplementa (RVK) (Burgess i Norris, 1982), agar gel imunodifuzija (AGID) i ELISA test (Ris i sar., 1984). ELISA test je pokazao veću osetljivost u odnosu na RVK i AGID (Myers i sar., 1972). Međutim, propisani standardni test i dalje je RVK (Corbel i sar., 1978; OIE Manual 2008).

Na osnovu dobijenih rezultata, može se oceniti da je u odnosu na podatke iz drugih zemalja nivo seroprevalence na *B. ovis* nizak, odnosno nizak stepen inficiranosti sa *B. ovis*. Dobijeni rezultati ispitivanja raširenosti infekcije su ohrabrujući i sa aspekta primenjenog RVK testa. Međutim, prema podacima iz literature, ELISA test koji primenjuju pojedine laboratorije je veoma osetljiv i specifičan metod i neke zemlje ga koriste u programima kontrole ove bolesti.

U daljem praćenju rasprostranjenosti ovog oboljenja preporučuje se korišćenje oba serološka metoda. Takođe je neophodno kod svih genitalnih lezija ovnova postaviti osnovanu sumnju na mogući epididimitis uzrokovan *B. ovis*-om. Tokom naših ispitivanja broj pregledanih životinja ne bi se mogao smatrati reprezentativnim u odnosu na ukupan broj ovaca, pre svega ovnova koji u širenju infekcije imaju prvorazredni značaj. Činjenica da je infekcija *B. ovis*-om dokazana u populaciji ovaca što ukazuje na potrebu da se ovoj infekciji mora posvetiti određena pažnja. U narednom periodu treba vršiti serološka ispitivanja ovnova jednom godišnje, upravo

iz razloga što rezultati naših ispitivanja ukazuju na nizak stepen prevalence, dok je prema podacima iz literature u zemljama koje su prvi put vršile ispitivanja na *B. ovis* utvrđen značajan procenat seroreaktora i preko 20%. Dobijeni rezultati ne bi trebali biti razlog da se epididimitis izazvan brucelama neopravdano zapostavi u budućnosti, već da se status niske prevalence za ovo oboljenje nastoji zadržati primenom mera koje bi sprečile unošenje i širenje infekcije kod ovaca. Ovnovi za priplod moraju se periodično klinički pregledati i vršiti kontrola kvaliteta njihovog semena. Voditi računa o zdravstvenom stanju ovnova kod uvođenja u zapat. Vršiti kvalitetan odabir i negu mladih ovnova za remont. Mlade ovnove držati odvojeno od starijih. Posebnu pažnju obratiti kod životinja iz uvoza na ovu infekciju.

Obolele životinje se mogu lečiti antibioticima i oksitetraciklinima, što se preporučuje kod nekih vrednih ovnova ali nije ekonomski isplativo. Fertilitet može ostati niska čak i ako je mikroorganizam eliminisan. Infekcija ovaca se prevenira kontrolom ovnova.

Brucella vrste se mogu eliminisati sa kontaminiranih predmeta i okoline primenom dostupnih dezinficijenasa kao što su: hipohloritni rastvori, 70% etanol, isopropanol, fenolni dezinficijensi, formaldehid, glutaraldehid i ksilen, međutim organska supstanca i niske temperature dovode do opadanja efikasnosti dezinficijenasa. Dezinficijensi za koje je pokazano da uništavaju *Brucellu* na kontaminiranim površinama su 2,5% Na-hipohlorit, 2-3% kaustična soda, 20% suspenzija kreča ili 2% rastvor formaldehida.

ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je nivo prevalence kod pregledanih grla ovaca za *B. ovis* na epizootiološkom području Južnobačkog okruga veoma niska i iznosi 0,89%. Na epizootiološkom području Srednjobanatskog okruga je dijagnostikovano nešto viši nivo prevalence za *B. ovis* gdje su ispitivani samo ovnovi i iznosi 4,29%, dok na epizootiološkom području Sremskog okruga nisu dijagnostikovana seropozitivna grla ovaca na *B. ovis*. Takođe je ustanovljeno da pregledani ovnovi sa kliničkim simptomima epididimitisa nisu bili seropozitivni na *B. ovis*.

LITERATURA

1. Blasko J.M.: *Brucella ovis*. Animal brucellosis, Boca Ration: CRC Press Florida, USA, 351-378, 1990.
2. Bricker B.J.: PCR as a diagnostic tool for brucellosis, *Vet Microbiol*, 90, 435-446, 2002.
3. Brown G.M., Ranger C.R., Kelley D.J.: Selective media for the isolation of *Brucella ovis*. *Cornell Vet*, 61, 265-280, 1971.
4. Buling M.S., Andersom B.C.: Association of sexual experience with isolation of various bacteria in cases of ovine epididymitis. *J Am Med Assoc*, 182, 372-374, 1983.

5. Burgess G.W., Mcowell J.W.: *Escherichia coli* epididymitis and seminal vesiculitis in a ram. *Aust Vet J*, 57, 479-480, 1981.
6. Burgess G.W., Norris M. J.: Evaluation of the cold complement fixation for diagnosis of ovine brucellosis. *Aust Vet J*, 59, 23-25, 1982.
7. Corbel M.J., Gill K.P.W., Thomas E.L.: Methods for the identification of *Brucella*. In: Fisheries and Food, Ministry of Agriculture, UK, ADAS, RCV 22, 1978.
8. Materola L., Tejero-Garcés A., Ficapal A., Shopayeva G., Blasco J.M., Marin C.M., López-Goni I.: Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in semen samples from rams. *Vet Microbiol*, 92, 65-72, 2003.
9. Marin C.M., Alabart J.L., Blasco J.M.: Effect of antibiotics contained in two *brucella* selective media on growth of *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. ovis*, *J Clin*, 34, 426-428, 1996.
10. Marin C.M., Jimenez De Bagues M.P., Blasco J.M., Gamazo C., Moriyon I., Diaz R.: Comparison of three serological tests for *Brucella ovis* infection of rams using different antigenic extracts. *Vet Rec*, 125, 504-508, 1989.
11. Myers D.M., Jones L.M., Varela-Diaz V.: 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, 1972.
12. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 6th edition, Part 2, Section 2.7, Chapter 2.7.9. Ovine Epididymitis (*Brucella ovis*), 2008.
13. Ris D.R., Hamel K.L., Long D.L.: Comparison of an enzyme-linked immunospecific assay (ELISA) with the cold complement fixation test for the serodiagnosis of *Brucella ovis* infection, *N Z Vet J*, 32, 18-80, 1984.
14. Worthington R.W., Stevenson B.J. & De Lisle G.W.: Serology and semen culture for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in chronically infected rams. *N Z Vet J*, 33, 84-86, 1985.

Primljeno: 15.11.2009.
Odobreno: 27.11.2009.