

Diagnóstico serológico, histopatológico y molecular de epididimitis ovina en carneros de Zacatecas, México

Serological, histopathological and molecular diagnosis of ovine epididymitis in rams from Zacatecas, Mexico

JOSÉ LUIS GUTIÉRREZ HERNÁNDEZ^{1*}, GERMÁN ISAURO GARRIDO FARIÑA², JORGE PABLO ACOSTA DIBARRAT³, EFRÉN DÍAZ APARICIO¹, VÍCTOR RUBÉN TENORIO GUTIÉRREZ¹ Y JORGE LUIS TÓRTORA PÉREZ²

¹Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal – Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.

²Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán – Universidad Nacional Autónoma de México.

³Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal – Universidad Autónoma del Estado de México

*Correo electrónico: joker_jet@hotmail.com

ENVIADO EL 02 DE NOVIEMBRE DE 2015/ ACEPTADO EL 10 DE DICIEMBRE DE 2015

RESUMEN

La epididimitis es considerada una enfermedad importante por sus efectos negativos sobre la fertilidad del rebaño, se asocia frecuentemente a infecciones por *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* e *Histophilus somni*. El objetivo del trabajo fue diagnosticar esta enfermedad mediante serología, histopatología y PCR en carneros clínicamente sanos del estado de Zacatecas, México. Mediante un muestreo de oportunidad se colectaron 552 muestras de suero y 114 muestras de semen. Se determinó la presencia de anticuerpos contra las tres bacterias utilizando inmunodifusión doble en gel (IDGA), también se caracterizaron las lesiones histopatológicas y la presencia de células de respuesta inmune en tejidos del tracto reproductor de carneros seropositivos. Mediante reacción en cadena de la polimerasa múltiple (PCR múltiple) se confirmó la presencia de las bacterias en semen de carneros positivos a la IDGA. Se observó una frecuencia de seropositividad a *B. ovis* de 16,3% (90/552), 3% (17/552) a *A. seminis* y 6,5% (36/552) a *H. somni*. Las lesiones propias de la enfermedad se encontraron principalmente en testículos y epidídimos, caracterizándose por infiltrado leucocitario, células plasmáticas y presencia de granulomas. 14 de 114 muestras de semen provinieron de animales seropositivos a *B. ovis*, la PCR múltiple demostró la presencia de la bacteria en nueve de ellas, una de estas también resultó positiva a *A. seminis*. El uso adecuado de las diferentes pruebas para el diagnóstico de epididimitis y sus combinaciones, permite la detección oportuna de animales infectados que aún no presentan signos clínicos, permitiendo implementar mejores estrategias de prevención y control.

Palabras clave: Epididimitis ovina, *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis*, *Histophilus somni*.

INTRODUCCIÓN

La epididimitis contagiosa del carnero ha sido definida como una enfermedad transmisible producida por *Brucella ovis*, caracterizada principalmente por la inflamación del epidídimo (Burgess, 1982). Sin embargo, también se han descrito cuadros de epididimitis ovina con aislamiento de bacterias diferentes a *B. ovis* que no parecen tener comportamiento epidemiológico, de estas bacterias presentes en la microbiota permanente o transitoria del tracto

ABSTRACT

Epididymitis is an important disease by its adverse effects on the flock fertility; *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* and *Histophilus somni* have been frequently associated to this illness. The aim was to diagnose the epididymitis in healthy rams from Zacatecas, Mexico, using serologic, histopathologic and PCR assays. Through convenience sampling were collected 552 samples of serum and 114 samples of semen from rams. Antibodies against the three bacteria were looked for using gel immunodiffusion (IDGA), histopathologic test was used for to characterize the injuries and the immune response cells in the tissues of the male reproductive tract. The multiplex polymerase chain reaction (PCR multiplex) was used to confirm the DNA presence of any of the three bacteria in semen from seropositive rams. The seropositive frequency for *B. ovis* was 16,5% (90/552), to *A. seminis* 3% (17/552) and for *H. somni* 6,5% (36/552). The lesions of the disease were mainly found in testis and epididymis, leukocyte, plasmatic cells and granulomas were seen. 14 of 114 semen samples were from seropositive *B. ovis* rams, the multiplex PCR test showed the presence of this bacteria in nine them, one of these was positive to *A. seminis* also. Appropriate use of different tests and their combinations for diagnosis of epididymitis allow an early detection of apparently healthy infected rams, allowing to implement best strategies by prevention and control.

Keywords: Ovine epididymitis, *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis*, *Histophilus somni*.

reproductor de los carneros, *Actinobacillus seminis* e *Histophilus somni* han sido de las más estudiadas y se sugiere que causan infecciones ascendentes a las glándulas sexuales accesorias, al epidídimo y en ocasiones al testículo. (Acosta, Díaz, Arellano & Tórtora, 2006; Acosta, Díaz, Tenorio, Suárez & Tórtora, 2007)

En los carneros afectados se observa disminución de la fertilidad hasta que ocurre esterilidad a causa de la epididimitis y la degeneración testicular. En ovejas infectadas de manera natural con *B. ovis* pueden ocurrir abortos en forma esporádica y un ligero aumento de la mortalidad perinatal. (Manazza,

Spath & Paolicchi, 2006; Kováčová, Zubrický, Babinčáková & Trávníček, 2007)

Los primeros datos sobre la epididimitis ovina en México causada por *B. ovis* datan de estudios serológicos realizados en 1974; en 1979 se logró el aislamiento de la bacteria a partir de casos clínicos en carneros procedentes de Estados Unidos (Pérez, Flores, De la Higuera & Trigo, 1979). La prevalencia de la epididimitis por *B. ovis* varía entre el 5 y 100% de los carneros del rebaño, pero habitualmente se encuentra entre el 10 y 40%. (Acosta & Tórtora, 2005)

Pese a que la enfermedad se ha incluido en la Campaña Nacional contra la Brucelosis (NOM-041-ZOO-1995), las medidas de control no se han implementado y la bacteria se sigue diseminando en el país, el diagnóstico individual de rebaños y animales sospechosos debe considerar diversas estrategias para apoyar alternativas de control eficaces. El objetivo del presente estudio fue diagnosticar la epididimitis ovina causada por *B. ovis*, *A. seminis* o *H. somni* en carneros del estado de Zacatecas, México, mediante el uso de pruebas serológica, molecular e histopatológica.

MATERIAL Y MÉTODOS

De diciembre de 2009 a enero de 2012 se realizó un muestreo de oportunidad en los municipios con mayor inventario ovino del estado de Zacatecas, dichos municipios se localizan en las coordenadas 25°00'51" N y 104°20'03" O, 21°04'43" N y 104°19'08" O, 20°48'19" N y 101°29'58" O, y 24°51'29" N y 100°40'55" O. Se lograron colectar 552 sueros de sementales ovinos de entre uno y cuatro años de edad, provenientes de 156 explotaciones, las razas con mayor frecuencia en las explotaciones fueron Dorper, Rambouillet y Katahdin.

Los sueros se evaluaron en su respuesta contra los antígenos de *B. ovis*, *A. seminis* e *H. somni* en pruebas de IDGA para cada bacteria. Cuando un animal mostraba seropositividad contra *B. ovis* se sugería al propietario la castración o sacrificio del semental para evitar la diseminación de la enfermedad en el rebaño. Pocos productores adoptaron esta medida de control y únicamente se realizó el sacrificio humanitario de 10 carneros, de los cuales se colectaron

muestras de testículo, epidídimo y glándulas anexas del tracto reproductor (vesículas seminales, glándulas bulbouretrales, ámpulas del conducto deferente y próstata diseminada) que se conservaron en formol amortiguado al 10% para su estudio histopatológico.

Paralelo al muestreo serológico y cuando el propietario de la explotación lo permitía, se colectaron muestras de semen mediante electroeyaculado, previa asepsia de la zona prepuccial de los carneros. Se logró la obtención de 114 muestras, las cuales se conservaron en congelación y se emplearon para la confirmación del diagnóstico de infección mediante la amplificación del ADN de cualquiera de las tres bacterias por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa múltiple (PCR múltiple), este ensayo se realizó en aquellos carneros que resultaron seropositivos a cualquiera de las tres bacterias estudiadas.

Para determinar la presencia de anticuerpos contra *B. ovis* en los carneros muestreados se empleó la prueba de IDGA (Alton, Jones, Angus & Verger, 1988) señalada en la Campaña Nacional contra la Brucelosis (NOM-041-ZOO-1995), la cual cuenta con una sensibilidad del 92% y una especificidad del 100% (Ridler & West, 2011). Esta prueba también fue utilizada para la detección de anticuerpos contra *A. seminis* e *H. somni*, para ello se preparó agarosa al 1,1% (UltraPure™ Agarose. Invitrogen, EUA) en una solución amortiguadora de boratos (PBS) pH 8,3 con 10% de NaCl (J.T. Baker, EUA) (Alton et al., 1988; Méndez, Díaz, Morales, Aguilar & Suárez, 1999), que fue vertida en cajas de Petri de plástico, hasta alcanzar un espesor de 3 mm y se dejó solidificar a temperatura ambiente, las cajas se conservaron a 4 °C hasta su uso.

Para la realización de la prueba se perforaron siete rosetas periféricas y una central en cada caja, cada roseta con seis pozos periféricos y uno central con una distancia de 4 mm entre pozos. Se colocó 15 µl de antígeno de *B. ovis*, *A. seminis* o *H. somni* en los pozos centrales y 15 µl de los sueros de cada carnero a evaluar en los pozos periféricos, en uno de estos pozos también se colocaron 15 µl de suero control positivo que correspondía al antígeno

utilizado para el diagnóstico; posteriormente se incubaron las cajas en cámara húmeda durante 48 a 72 h. Los sueros que presentaron una banda de precipitación frente al pozo que contenía el antígeno utilizado fueron considerados como positivos.

Para determinar la presencia de anticuerpos contra *B. ovis* se utilizó como antígeno el extracto salino caliente de la cepa REO 198 de *B. ovis* (Myers & Siniuk, 1970), sembrada en agar sangre (BD Bioxon, México) e incubada durante 48 h con 10% de CO₂. Las colonias se cosecharon en PBS a un volumen final de 20 ml, aproximadamente; la suspensión se centrifugó a 15 000 xg durante 15 min (Microcentrifuga Prism™ Air-Cooled, Labnet) y se descartó el sobrenadante; el paquete celular obtenido fue resuspendido en 20 ml de PBS y se centrifugó nuevamente a 15 000 xg durante 15 min. Posteriormente se colocó en autoclave a vapor fluente (100 °C) durante 15 min y se dejó enfriar para ser centrifugado a 15 000 xg durante 15 min; el sobrenadante se dializó durante 48 h y posteriormente se volvió a centrifugar a 15 000 xg. El sobrenadante resultante constituyó el antígeno y se conservó a 4 °C hasta su uso.

Para la detección de anticuerpos contra *A. seminis* se preparó un antígeno utilizando la cepa de referencia 15768 de la de la American Type Culture Collection (ATCC), la cual se sembró en agar sangre a 37 °C durante 48 h con 10% de CO₂, fue cosechada en solución salina fisiológica y congelada a -40 °C durante 24 h; posteriormente se descongeló la suspensión de bacterias, se sonicó durante 15 min a alta intensidad (Sonicador VC-505, Sonics) y se centrifugó durante 10 min a 10 000 xg. El sobrenadante obtenido constituyó el antígeno y fue conservado a 4 °C hasta su uso. (Williams, Smith & Muldock, 1978)

El antígeno utilizado para la detección de anticuerpos contra *H. somni* fue preparado con la cepa de referencia 2336 ATCC bajo las mismas condiciones utilizadas para la obtención del antígeno de *A. seminis*. Se utilizaron como controles positivos el suero de un ovino inoculado vía subcutánea con la cepa REO 198 de *B. ovis*, y los sueros de dos conejos inoculados con las cepas de *A. seminis* 15768 ATCC e *H. Somni* 2336 ATCC, respectivamente.

La frecuencia de los anticuerpos detectados contra cada bacteria se calculó dividiendo el número de casos positivos a la prueba de IDGA entre el número total de sueros analizados, el resultado obtenido fue multiplicado por 100 para expresar el valor obtenido en porcentaje.

Las muestras de tejido colectadas fueron fijadas en formol al 10% durante 48 h, posteriormente se lavaron con agua para eliminar el exceso de fijador y se deshidrataron en soluciones de alcohol con gradientes de concentración progresivos. Una vez deshidratados, los tejidos fueron incluidos en parafina para después ser cortados a 4 µm de espesor en el microtomo (Leica RM2125 RTS). Los cortes obtenidos fueron montados en portaobjetos, desparafinados y rehidratados para después ser teñidos mediante la técnica de rutina con Hematoxilina-Eosina (HE). Los cortes teñidos fueron observados al microscopio (Leica DM1000). (Aguilar, 2008)

Se utilizó la PCR múltiple para la detección del ADN de *B. ovis*, *A. seminis* y/o *H. somni* en las muestras de semen que provinieran de carneros IDGA positivos a cualquiera de las tres bacterias. Para la extracción del ADN a partir de las muestras obtenidas se empleó una prueba comercial (QIAamp® DNA Mini Kit. QIAGEN, Alemania). El ensayo se realizó bajo las indicaciones del fabricante, utilizando 100 µl de semen para la extracción, el DNA obtenido fue resuspendido en 50 µl de amortiguador AE provisto por el fabricante de la prueba. Esta prueba también fue empleada para la extracción del ADN de las cepas de referencia de *B. ovis*, *A. seminis* e *H. somni*, los cuales fueron utilizados como control positivo para la PCR múltiple.

Para realizar la PCR múltiple se utilizó la prueba Multiplex PCR Kit® (QIAGEN, Alemania), los iniciadores para la amplificación de los fragmentos de DNA de cada bacteria fueron diseñados de acuerdo con las características descritas por Saunders, Reddacliff, Berg & Hornitzky, (2007), para la amplificación del ADN de *B. ovis* se emplearon los iniciadores ISP1 (GGTTG-TTAAAGGAGAACAGC) e ISP2 (GACGATAGCGTTTCAACTTG) obteniendo un producto

de amplificación de 690 pares de bases (pb), para *A. seminis* se emplearon los iniciadores SRJAS1 (CTTATCTTTCTTAAGCCCTGAC) y SRJAS2 (AAGAAAAGACGAAGAGACATT) con un producto de amplificación de 436 pb, y para *H. somni* se emplearon los iniciadores HS-453-F (GAAGGCGATTAGTTTAAGAG) y HS-765-R (ACTCGAGCGTCAGTATCTTC) con un producto de amplificación de 113 pb.

El volumen final para la reacción fue de 50 µl, constituido por 25 µl de 2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (concentración final 1X, 3mM de Mg²⁺), 0,5 µl de cada iniciador (concentración final 0,1 µM/iniciador), 10 µl de 5x Q-Solution (concentración final 1X) 1 µl de muestra de ADN (concentración final ≤ 1 µg de ADN/reacción) y 8 µl de H₂O libre de DNAsas. Las condiciones para la reacción fueron programadas en un termociclador T100™ (Bio-Rad) bajo las siguientes especificaciones: desnaturación inicial a 96 °C durante 10 min, 35 ciclos con etapas de desnaturación a 94 °C por 30 s, alineación a 57 °C durante 60 s y extensión a 72 °C durante 60 s; por último, se realizó una extensión final a 72 °C durante 6 min.

Los productos finales de la PCR múltiple fueron separados mediante electroforesis en gel (Aguilar, 2008) en una cámara horizontal durante 45 min a 85 Volts (Wide Mini-Sub Cell™ GT Cell & PowerPac™ Basic Power Supply, Bio-Rad), para ello se preparó un gel de agarosa (UltraPure™ Agarose. Invitrogen, EUA) al 1%, el cual fue disuelto en una solución amortiguadora de Tris base 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM (TAE 1X. AMRESCO, EUA), antes de la solidificación del gel se agregó bromuro de etidio (Sigma-Aldrich, Australia) a una concentración final de 0,5 µg/ml. Se utilizó como amortiguador de corrida la misma solución usada para la preparación del gel. Para lograr la visualización de bandas de DNA mediante luz UV se utilizó un fotodocumentador (ChemiDoc™ MP System, Bio-Rad).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los 552 sueros de carneros del estado de Zacatecas evaluados, 90 (16,5%) resultaron seropositivos a *B. ovis*, 17 (3%) a *A. seminis*

y 36 (6,5%) a *H. somni*. En 14 de los 552 carneros se demostraron resultados serológicos positivos a más de una de las bacterias evaluadas, uno de ellos resultó seropositivo a los antígenos de las tres bacterias, cinco resultaron positivos a *B. ovis* e *H. somni*, cuatro a *B. ovis* y *A. seminis*, y cuatro más a *A. seminis* e *H. somni*. (Cuadro 1)

Ninguno de los 10 animales IDGA positivos a *B. ovis* que fueron sacrificados mostraron cambios en el tamaño, consistencia u otro tipo de alteraciones en testículos y epidídimos al momento de la inspección clínica. Sin embargo, al evaluarlos histológicamente, todos los órganos colectados presentaron infiltrados de células linfocíticas, plasmáticas y macrófagos, con excepción de la glándula bulbouretral. Las lesiones en testículos y epidídimos fueron más severas en comparación con las observadas en los demás órganos del tracto reproductor evaluados.

En testículos y epidídimos se observó la presencia de focos necróticos, formación de granulomas y en algunos casos, la presencia de células gigantes de Langhans; también se observó la presencia de células de respuesta inmune en contacto con espermatozoides maduros contenidos en los conductos de los testículos y en la cola de los epidídimos.

Solo 14 de las 114 muestras de semen colectadas provinieron de animales seropositivos a *B. ovis*, estas se emplearon para confirmar el diagnóstico de infección de esta bacteria mediante PCR múltiple y se buscó detectar la asociación de otras bacterias como *A. seminis* e *H. somni*. En 9 de las 14 muestras se logró amplificar el ADN de *B. ovis* (Figura 1), en

Cuadro 1. Resultados serológicos positivos a *B. ovis*, *A. seminis* e *H. somni* obtenidos mediante IDGA

Número de muestras	<i>B. ovis</i>	<i>A. seminis</i>	<i>H. somni</i>
80	+	-	-
8	-	+	-
26	-	-	+
1	+	+	+
4	+	+	-
5	+	-	+
4	-	+	+
Total de positivos	90	17	36

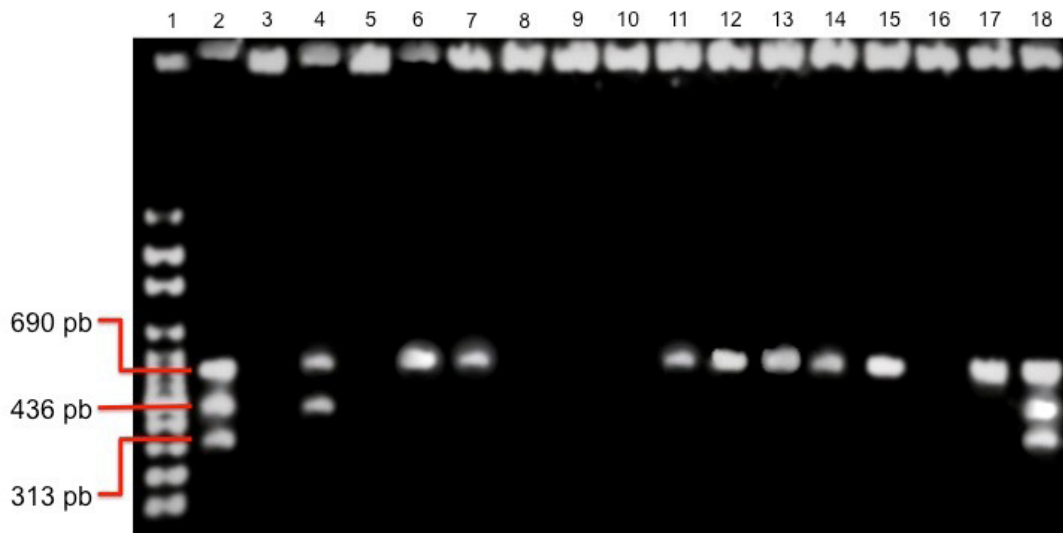


Figura 1. Productos obtenidos en PCR múltiple a partir de DNA bacteriano en semen. Carril 1. marcador molecular. Carriles 2 y 18. control positivo a *B. ovis* (690 pb), *A. seminis* (436 pb) e *H. somni* (313 pb). Carriles 3 y 16. control negativo. Carriles 4 al 17. ADN amplificado a partir de muestras de semen.

una de estas 9 también se demostró la presencia de ADN de *A. seminis* a pesar de que en el análisis serológico no se detectaron anticuerpos contra esta bacteria. Ninguna muestra de semen resultó positiva a *H. somni*.

Un estudio realizado en carneros del altiplano mexicano, en el cual se diagnosticó la presencia de anticuerpos contra *B. ovis* y *A. seminis* en 111 sueros, se reportó que 9% de ellos resultaron positivos a *B. ovis* y 9% más a *A. seminis*, demostrando la presencia de anticuerpos contra ambas bacterias en cinco animales mediante IDGA (10). En ese mismo estudio, los resultados obtenidos en un ELISA para detectar anticuerpos contra *B. ovis* mostró una seroprevalencia de 22,5%. En otro estudio se utilizó también la prueba de IDGA para detectar la presencia de anticuerpos contra *A. seminis* en carneros experimentalmente infectados con la bacteria por diferentes vías de inoculación, obteniendo resultados variables (Acosta et al., 2006). Carrera, Echavarría, Aréchiga, Bañuelos y Tórtora (2013) reportan una prevalencia de 18,6% para *B. ovis* en 153 rebaños de Zacatecas utilizando la prueba de IDGA, el 10,5% de esos rebaños presentaron al menos un semental seropositivo, siendo las explotaciones ovinas que utilizan el sistema de producción semi-intensivo las que tienen una prevalencia más elevada (86,1%), en este mismo estudio se observó que la prevalencia de *B.*

ovis fue más alta en los rebaños más grandes y con mayor número de vientres y sementales, relacionándola principalmente con el sistema de explotación empleado, más que a la relación hembra-macho o con el sistema de emparejamiento utilizado. Otros autores mencionan que la prevalencia de la enfermedad por *B. ovis* oscila entre el 5 y 100%, dependiendo de las características del rebaño estudiado y la introducción de nuevos sementales (Acosta & Tórtora, 2005). En el presente trabajo se encontró una frecuencia para *B. ovis*, *H. somni* y *A. seminis* de 16,3, 6,52 y 3,07%, respectivamente, sugiriendo que la frecuencia de epididimitis en los carneros del estado de Zacatecas puede estar asociada a la presencia de otras bacterias diferentes a *B. ovis*. La presencia de estas bacterias y su participación en la aparición de la enfermedad podría también estar asociada a las condiciones sanitarias de las instalaciones, y no al manejo de los animales o sistema de explotación empleado, como puede ocurrir en infecciones por *B. ovis*.

El uso de la prueba de IDGA para el diagnóstico de *B. ovis* ha demostrado tener una alta especificidad pero baja sensibilidad, en combinación con ELISA la sensibilidad en la evaluación de un rebaño aumenta hasta el 100% (Scalman, 1992); por lo anterior, la IDGA ha sido recomendada como prueba oficial para el diagnóstico de la enfermedad en

México (Núñez, Díaz, Velázquez, Trigo & Suárez, 1997). Para la realización de la prueba, el antígeno preparado a partir del extracto salino caliente de *B. ovis* ha mostrado mejores resultados en cuanto a sensibilidad y especificidad (Blasco, 1990). La variabilidad de las pruebas serológicas en las respuestas a las bacterias estudiadas en animales con aislamientos positivos en semen y aun en animales experimentalmente infectados, indica que los resultados deben emplearse con reserva; cuando se desconoce la condición de una población de carneros y cuando se logran resultados positivos, la evidencia sugiere que las respuestas falso negativas son abundantes en esta patología, a lo que debe agregarse la baja sensibilidad de la prueba de IDGA.

No se encontró literatura que describa a la IDGA como prueba diagnóstica para la epididimitis causada por *H. somni* en poblaciones de ovinos naturalmente infectadas. Esta bacteria se asocia a la flora normal del aparato reproductor del carnero y en ocasiones está relacionada con la epididimitis; también se ha descrito como un patógeno relacionado con infecciones del aparato respiratorio de rumiantes, como causante de inflamación de la glándula mamaria, conjuntivitis y septicemia (Frederick & Eugene, 1989); por lo que el valor diagnóstico de la IDGA o de cualquier otra prueba serológica dirigida a esta bacteria sería poco confiable. Considerando que *A. seminis* es una bacteria de la microbiota permanente o transitoria del tracto reproductor de los carneros (Scalman, 1992), al igual que con *H. somni*, y aunque se ha demostrado que la sensibilidad de la IDGA para la detección de anticuerpos contra ambas bacterias está por encima del 92% y la especificidad por encima del 99%, es probable que los animales presenten anticuerpos contra estos microorganismos sin que padezcan la enfermedad, por lo que es necesario considerar en forma destacada el cuadro clínico y en todo caso aunado a este, demostrar la presencia de la bacteria mediante cultivo o PCR a partir de semen o muestras de tejidos lesionados obtenidas de los casos clínicos de la enfermedad. Por este motivo, es muy importante que los animales clínicamente

afectados sean castrados y el contenido escrotal remitido al laboratorio para incrementar las posibilidades de aislamiento o identificación del o los microorganismos involucrados; el comportamiento epidémico de *B. ovis* y las estrategias para su control, son sustancialmente diferentes a las de las demás bacterias involucradas en epididimitis.

B. ovis y *A. seminis* se han recuperado de ámpula deferente y vesícula seminal (Acosta et al., 2006) y ocasionalmente se han observado alteraciones en testículos y glándulas anexas (Frederick & Eugene, 1989; Al-Katib & Dennis, 2008). Se ha reportado también la presencia de lesiones granulomatosas e infiltrados de linfocitos y células plasmáticas idénticos a los causados por *B. ovis* en el epidídimo de animales experimentalmente infectados con *A. seminis* (Acosta et al., 2007). En el presente trabajo, las muestras de tejido colectadas para diagnóstico histopatológico presentaron lesiones coincidentes con las descritas por otros autores (Paolicchi, 2001; Carvalho, 1998), siendo la más frecuente la presencia de infiltrados celulares de linfocitos y células plasmáticas. Aunque en este trabajo las muestras de testículos y epidídimos que presentaron lesiones provinieron de animales seropositivos a *B. ovis*, en un estudio epidemiológico con 110 carneros de diferentes rebaños de Cataluña (España) se observó que no existió correlación entre los resultados serológicos, bacteriológicos y las lesiones de la enfermedad. (Carvalho et al., 2011)

Se ha demostrado que el examen clínico de los testículos y epidídimos tiene poco valor diagnóstico en el caso de la infección por *B. ovis*, debido a que existen animales que sufren la enfermedad, pero no presentan signos clínicos de ella y pueden infectar a otros carneros (Ficapal, Alonso, Velasco, Moriyon & Blasco, 1995). También se han descrito otras bacterias como *A. seminis*, *H. somni*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Pasteurella sp.*, *Staphylococcus sp.* y *Streptococcus sp.* como causantes de epididimitis en carneros (Ficapal et al., 1995; Blasco, Marín, Barderan, Moriyón & Díaz, 1987; Cox, Gorrie, Nairin & Ward, 1997). El estudio bacteriológico a partir de tejido lesionado o semen es necesario para

completar el diagnóstico de la enfermedad y tomar medidas de control y profilaxis adecuadas y efectivas (Acosta et al., 2007; Paolicchi, 2001; Rodolakis & Bernard, 1977).

Se ha utilizado la PCR para demostrar la presencia de *B. ovis* en el semen de carneros, sugiriéndola como una prueba complementaria al cultivo bacteriológico (Saunders et al., 2007; García, Blasco & Barberán, 2009); aunque dicha prueba cuenta con una sensibilidad y especificidad muy cercana al 100%, la sensibilidad puede ser disminuida debido a las características de la muestra a estudiar (García et al.). Por otra parte, se ha demostrado que en muestras de semen de animales serológicamente positivos no siempre se logra el aislamiento bacteriológico (Worthington, Stevenson & de-Liste, 1985; Manterola et al., 2003). En este trabajo las muestras de semen provinieron únicamente de animales IDGA positivos a *B. ovis*, de las cuales 9 de 14 resultaron positivas a la PCR, la discrepancia en los resultados puede deberse a que el curso de la enfermedad y el tiempo de incubación de la bacteria en los carneros estudiados, no alcanzó en todos los casos la excreción de esta en el fluido seminal y a que la eliminación de la bacteria por semen no es continua.

En un trabajo realizado con 295 muestras de semen colectadas mediante vagina artificial y electroeyaculado (Saunders et al., 2007), se reportó una mayor presencia de *H. somni*, seguido de *A. seminis* y *B. ovis* mediante PCR múltiple. En el presente estudio la colecta de material seminal se realizó mediante electroeyaculado previa asepsia de la zona prepucial de los sementales, en los resultados obtenidos se observó una mayor presencia de *B. ovis*, se demostró la presencia de *A. seminis* en una muestra y no fue posible demostrar la presencia de *H. somni*. La variación en los resultados de ambos trabajos puede deberse a que las muestras estudiadas en este caso fueron obtenidas de animales previamente demostrados como IDGA positivos a *B. ovis*, al manejo realizado previo a la colecta de las muestras o bien, a que la eliminación de las bacterias a través del semen no es constante en los animales con epididimitis, siendo también un factor impor-

tante el tiempo de infección y el manejo que se da a las muestras luego de su colecta para su conservación. (Manterola et al., 2003)

CONCLUSIONES

El uso adecuado de las diferentes pruebas para el diagnóstico de epididimitis ovina, así como la combinación de algunas de ellas, permite la detección oportuna de animales infectados que aún no presentan signos clínicos, mejorando las estrategias de prevención y control contra *B. ovis* u otras bacterias causantes de la enfermedad, evitando así la implementación de estrategias equivocadas contra estas bacterias, que de todas formas comprometen la eficiencia productiva y reproductiva de los rebaños ovinos.

La adquisición de animales libres de la enfermedad, el manejo reproductivo de los ovinos en condiciones salubres, el constante monitoreo mediante el uso de las tecnologías diagnósticas disponibles actualmente y la eliminación de animales que puedan participar como portadores de agentes causales de epididimitis, deben ser las medidas de prevención y control más importantes a implementar en los rebaños ovinos

AGRADECIMIENTOS

Programa de Cátedras de FES Cuautitlán-UNAM: GC-01 PATOLOGÍA y ENFERMEDADES DE LOS RUMIANTES.

REFERENCIAS

- Acosta, D.J. & Tórtora, P.J. (2005). Epidemiología, prevención y control de la Epididimitis ovina. En: Rodríguez VRI (ed.), Enfermedades de importancia económica en producción animal (pp. 379-392). Distrito Federal, México. McGraw-Hill Interamericana-Univ. Autónoma de Yucatán.
- Acosta, D.J.; Díaz, A.E.; Arellano, R.B. & Tórtora, P.J. (2006). Inducción experimental de epididimitis en ovinos por inoculación intrauretral con *Actinobacillus seminis*: Estudio bacteriológico, serológico e histopatológico. *Técnica Pecuaria en México*, 44, 257-267.
- Acosta, D.J.; Díaz, A.E.; Tenorio, G.V.; Suárez, G.F. & Tórtora, P.J. (2007). Determination of pathological changes in the reproductive track, IgG, IgM and IgA antibodies in blood, seminal plasma and smegma of rams inoculated with *Actinobacillus seminis*. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 6, 105-113.
- Aguilar, M.M. (2008). Técnicas histológicas. En: González M.M. (ed.), *Técnicas de laboratorio en biología celular y molecular* (pp. 183-204). Distrito Federal, México. AGT Editor.

- Al-Katib, W.A & Dennis, S.M. (2008). Pathological changes in accessory sex organs of rams following experimental infection with *Actinobacillus seminis*. *New Zealand Veterinary Journal*, 56, 319-325.
- Alton, G.G.; Jones, L.M.; Angus, R.D. & Verger, J.M. (1988). *Brucella ovis*. En: *Techniques for the brucellosis laboratory*. (pp. 157-167). Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). Francia.
- Blasco, J.M.; Marín, C.M.; Barderan, M., Moriyón, I. & Díaz, R. (1987). Immunization with *Brucella melitensis* Rev 1 against *Brucella ovis* infection in rams. *Veterinary Microbiology*, 14, 381-392.
- Blasco, M.J.M. (1990). Epidemiología, patogenia y cuadro clínico. En: Blasco, M.J.M & Moriyon, U.I. (eds.), *Brucelosis ovina. Tratado de patología y producción ovina*. (pp. 25-32). Zaragoza, España. Luzans.
- Burgess, G.W. (1982). Ovine contagious epididymitis: a review. *Veterinary Microbiology*, 7, 551-575.
- Carrera, C.J.M.; Echavarría, C.F.G.; Aréchiga, F.C.F.; Bañuelos, V.R & Tórtora, P.J.L. (2013). Posibles factores de riesgo en la prevalencia serológica de *Brucella ovis* en Zacatecas, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 4, 61-74.
- Carvalho, C.A. (1998). Epididimitis contagiosa de los carneros por *Brucella ovis*. *Revista del Colegio de Veterinarios de la Provincia de Buenos Aires*, 79, 67-71.
- Carvalho, C.A.; Moustacas, V.S.; Xavier, M.N.; Costa E.A.; Costa; L.F.; Silva, T.M.A.; Paixao, T.A.; Borges, A.M.; Gouveia, A.M. & Santos, R.L. (2011). Andrological, pathologic, morphometric, and ultrasonographic findings in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. *Small Ruminant Research*, 102, 213-222.
- Cox, J.C.; Gorrie, C.J.; Nairn, R.C. & Ward, H.A. (1997). A comparison of methods for the serological diagnosis of *Brucella ovis* infection. *British Veterinary Journal*, 133, 442-445.
- Ficapal, A.; Alonso, U.B.; Velasco, J.; Moriyón, I. & Blasco, J.M. (1995). Diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams with an ELISA using protein G as conjugate. *The Veterinary Record*, 137, 145-147.
- Frederick, W. & Eugene, D. (1989). The *Haemophilus somnus* disease complex (Haemophilosis): A review. *Canadian Veterinary Journal*, 30, 816-822.
- García, P.L.; Blasco, J.M. & Barberán, M. (2009). *Pasteurellosis* as a cause of genital lesions in rams. A descriptive study. *Small Ruminant Research*, 83, 111-115.
- Kováčová, D.; Zubrický, P.; Babinčáková, M. & Trávníček, M. (2007). Importance of serological diagnostics in ovine epididymitis caused by *Brucella ovis*. *Bulletin Veterinary Institute of Pulawy*, 51, 219-224.
- Manazza, J.; Spath, E. & Paolicchi, F. (2006). *Brucelosis ovina*. *Revista del Colegio de Veterinarios de la Provincia de Buenos Aires*, 11, 42-44.
- Manterola, L.; Tejero, G.A.; Ficapal, A.; Shopayeva, G.; Blasco, J.M.; Marin, C.M. & López, G.I. (2003). Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in semen samples from rams. *Veterinary Microbiology*, 92, 65-72.
- Méndez, N.G.; Díaz, A.E.; Morales, A.J.; Aguilar, R.F. & Suárez, G.F. (1999). Epididimitis ovina: estudios bacteriológico y serológico. *Veterinaria México*, 30, 329-336.
- Myers, D.M. & Siniuk, A.A. (1970). Preliminary report on the development of a diffusion-in-del method for the diagnosis of ram epididymitis. *Applied Microbiology*. 19, 335-337.
- Núñez, T.E.; Díaz, A.E.; Velázquez, Q.F.; Trigo, T.J.F. & Suárez, G.F. (1997). Presencia de anticuerpos contra diferentes anticuerpos de *Brucella* en sementales ovinos jóvenes. *Veterinaria México*, 28, 235-240.
- Paolicchi, F. (2001). Epididimitis ovina por *Brucella ovis*: lesiones genitales y respuesta inmune antiespermática. *Revista del Colegio de Veterinarios de la Provincia de Buenos Aires*, 82, 86-88.
- Pérez, E.; Flores, C.R.; De la Higuera, J.A. & Trigo, T.F. (1979). Diagnóstico y descripción de un brote de epididimitis ovina en México originado por *Brucella ovis*. *Veterinaria México*, 10, 221-226.
- Ridler, A.L. & West, D.M. (2011). Control of *Brucella ovis* infection in sheep. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 27, 61-66.
- Rodolakis, A. & Bernard, K. (1977). Isolation of *Chlamydia* from the genitalia of rams affected by clinical epididymitis. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, 50, 65-70.
- Saunders, V.F.; Reddacliff, L.A.; Berg, T. & Hornitzky, M. (2007). Multiplex PCR for the detection of *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* and *Histophilus somni* in ram semen. *Australian Veterinary Journal*, 85, 72-77.
- Scalman, C.M. (1992). Etiopathogenesis of epididymitis in ram lambs. *Memorias del V Congreso Nacional de Producción Ovina. Asociación Mexicana de Técnicos especialistas en Ovinocultura. Monterrey, Nuevo León. México*, 342-349.
- Williams, M.J.; Smith, G.L. & Muldock, M.F. (1978). Immunogenicity of a *Haemophilus somnus* bacterin in cattle. *American Journal of Veterinary Research*. 39, 1756-1762.
- Worthington, R.W.; Stevenson, B.J. & de-Liste, G.W. (1985). Serology and semen culture for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in chronically infected rams. *New Zealand Veterinary Journal*, 33, 84-86.