



11664
Universidad Nacional Autónoma
de México

1
Facultad de Estudios Superiores "Cuautitlán"

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias
de la Producción y de la Salud Animal

Título: "Patogenia de la Epididimitis por *Actinobacillus
seminis* en Ovinos"

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A D A P O R

Jorge Pablo Acosta Dibarrat

Tutor Principal: Jorge Luis Tórtora Pérez

Comité Tutorial: Jorge Luis Tórtora Pérez

Efrén Díaz Aparicio

Javier Valencia Méndez

29415

Cuautitlán Izcalli, 2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Demórate aquí en
la luz mayor
de este mediodía
donde encontrarás
con el pan al Sol la
mesa tendida.

(De "Canción de las cosas Simples")
César Isella-Tejada

Dedicada:

A la memoria de mi abuela Margarita Heyberger,
de mi tío Emilio Jorge Dibarrat y de María de las Mercedes Reyes que
están presentes en cada momento de mi vida.

A mi esposa Patricia,
a vos mi amor por dejar el llano por los cerros para caminar juntos.

A mi padre Walter Acosta Ferreira. Viejo vos me enseñaste a ver la
tormenta bien lejos en el horizonte.
Aprendí que para hacer un buen asado además de buena carne, leña de
monte y paciencia, se necesita tener con quien compartirlo.

A mi madre Lydia Dibarrat Heyberger. Mamá, gracias a vos descubrí que
al asma no lo calma la aminofilina sino la ternura.
El mejor pan era el que venía contigo bien tempranito después de tu
guardia.

A mis hermanos, sobrinos y amigos que por suerte son muchos.

Agradecimientos Institucionales

Esta tesis corresponde a estudios realizados con una beca otorgada por el **Gobierno de México** a través de la **Secretaría de Relaciones Exteriores**. Por lo cual agradezco al Gobierno Mexicano y a la Secretaría de Relaciones Exteriores por el otorgamiento de la Beca que permitió llevar a cabo mis estudios de Maestría y conocer este hermoso pueblo.

Al **Laboratorio de Microbiología del CENID-Microbiología, del INIFAP-SAGAR** ubicado en el Km 15.5 de la carretera México-Toluca. Col. Palo Alto, Cuajimalpa, DF. México.

A la **Facultad de Estudios Superiores "Cuautitlán"- UNAM** ubicado en el Km 2.5 de la carretera Cuautitlán - Teoloyucan, San Sebastian Xhala, Cuautitlán Izcalli, CP. 54700. Estado de México.

A la **Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República Oriental del Uruguay** en la cual realicé mis estudios de licenciatura.

Agradecimientos Académicos

A mis tutores **Dr. Jorge Tórtora Pérez, Dr. Efrén Díaz Aparicio, Dr Javier Valencia Méndez**, por su amistad, consejos para llevar a delante la tesis.

A los miembros de mi jurado **Dr. Francisco Suárez Gúemes, Dr. Victor Tenorio Gutierrez, Dr. Javier Valencia Méndez, Dr. Jorge Luis Tórtora Pérez** y al **Dr. Gilberto Chavez Gris** por revisar y corregir este trabajo.

A todo el personal técnico del laboratorio de Microbiología de Microbiología del CENID-Microbiología, del INIFAP-SAGAR por su colaboración.

A la **Mtra. Beatriz Arellano** por su colaboración en la realización de las pruebas de PCR. A la **Mtra. Laura Hernandez** por los consejos en el estudio bacteriológico. A la **MVZ. Gabriela Palomares**, al **MVZ. Enrique Herrera** y al **Sr. Guadalupe de la Rosa** por su colaboración en el trabajo de campo. Al **MVZ. Germán Garrido** a la **MVZ. Yolanda Romero** en la realización de cortes histopatológicos.

RESUMEN

La epididimitis en carneros es considerada una enfermedad económicamente importante, por sus efectos adversos sobre la fertilidad. Esta patología ha sido primordialmente asociada a *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* y a una gran variedad de microorganismos que incluyen *Histophilus ovis*, *Haemophilus somnus*, *Pasteurella haemolytica* y *Pasteurella multocida*. En México, existen reportes de casos de epididimitis por *A. seminis* desde el año 1986, recientemente se determinó una prevalencia del 9 % en el Altiplano Central por pruebas de inmunodifusión doble en agar. La patogenia de la enfermedad es poco clara, las observaciones más frecuentes coinciden con el desarrollo puberal, en animales en muy buen estado nutricional. En el experimento I se plantea la posibilidad de reproducir la epididimitis por *A. seminis* mediante la inoculación intrauretral (IU) del patógeno en borregos de 24 semanas en borregos, sometidos a tratamiento hormonal con hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) (n=4) por vía parenteral y a tratamiento traumático irritativo de la cola del epidídimo con etilenglicol (n=4) previo a la inoculación. En el experimento II se inoculó a cuatro borregos con *A. seminis* intradefrente (ID). En el experimento III se estudiaron las lesiones histopatológicas producidas por la inoculación de *B. ovis* (n=5) y *A. seminis* (n=3) por separado y en forma conjunta (n=5) en la cola del epidídimo. Semanalmente se tomaron muestras de suero para la realización de estudios serológicos por doble inmunodifusión en agar y de semen para estudios de calidad y bacteriología. Se sacrificaron en forma humanitaria a los 35 días y se tomaron muestras de las glándulas anexas, testículos y epidídimos para la realización de estudios bacteriológicos e histopatológicos. De los animales tratados previamente con GnRH, a los 15 días posinoculación se recuperó la bacteria del semen pero no del aparato genital al momento de la necropsia. Se encontraron lesiones histopatológicas en las colas del epidídimo en 3 de 4. Del grupo tratado con etilenglicol no se recuperó la bacteria de la cola del epidídimo tratada, a pesar de que el tratamiento provocó lesiones de tipo cuerpo extraño, en 1 de 4 se aisló *A. seminis* de la vesícula seminal y del ámpula del deferente. De los animales sin tratamiento previo e inoculación IU (n=4) no se recuperó la bacteria del aparato genital pero sí de los muestreos de semen. En 4 de 8 animales inoculados con *A. seminis* intraepididimal (IE) se recuperó la bacteria de la cola del epidídimo y en 2 de 3 de las glándulas anexas. En todos los grupos, incluso en los controles, se aislaron bacterias distintas de las inoculadas, principalmente de las glándulas anexas, provocando lesiones de poca intensidad o sin la existencia de cambios patológicos. En los animales inoculados intradefrente (ID) no se aisló la bacteria de la cola del epidídimo, pero sí de las glándulas anexas. Las lesiones provocadas por *A. seminis* y *B. ovis* en las colas del epidídimo resultaron similares, caracterizadas por presencia de vesículas intraepiteliales e hiperplasia de la mucosa epitelial, presencia de polimorfonucleares en el interior del túbulo epididimal, infiltración linfoplasmocitaria y fibrosis intersticial. Se constató la presencia de granulomas espermáticos en cola y cabeza de algunos epidídimos coincidentes con la recuperación de *B. ovis*, otras bacterias o sin aislamiento. De un total de 19 animales que recibieron *A. seminis* ya sea vía IU o IE, 5 resultaron positivos a la serología (26 %), constatándose reacciones dudosas en otros 5 (26%). De 8 animales en los que se recuperó *A. seminis* del semen, 6 (75%) presentaron células inflamatorias en el mismo. Se constató la rápida eliminación de *A. seminis* de la cola del epidídimo, debido posiblemente a la respuesta inflamatoria intensa y su permanencia en las glándulas anexas.

Palabras clave: Epididimitis, borregos, *Actinobacillus seminis*, *Brucella ovis*, glándulas anexas, histopatología, bacteriología.

ABSTRACT

Epididymitis in rams is an important disease with negative economical impact for its adverse consequences on fertility. This pathology has been primarily associated with *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* and to a great variety of microorganisms like *Histophilus ovis*, *Haemophilus somnus*, *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida*. In Mexico there has been reports of epididymitis produced by *A. seminis* since 1986. Recently a 9 % prevalence was determined using double immunodiffusion assay in the Central Plateau of the country. The pathogenesis of the disease is unclear, the most frequent observations seem to coincide with the puberty development in animals under very good nutritional conditions. The aim of this work was to reproduce the epididymitis using 24 weeks age lambs. Three experiments were performed using different groups of rams with in each other. Experiment one, animals were challenged with *A. seminis* inoculation into the urethra, group one (n=4) animals were treated with a parenteral application of Gonadotropin-releasing hormone (GnRH), second group (n=4) treatment was a traumatic irritation of the epididymis with ethylenglycol. In experiment two, the animals (n=4) was challenged with a inoculum of *A. seminis* placed in the vas deferens (IVD). The third experiment, inoculums were deposited in the epididymis tail, group one *A. seminis* (n=3), group two (n=5) *B. ovis*, final group (n=5) *B. ovis* / *A. seminis* (n=5) together. Serum and semen samples were periodically collected after the challenge for serology, bacteriology and semen quality assays, respectively. Thirty-five days post challenged animals were euthanized. Samples of accessory glands, testicles and epididymis were taken to complete the bacteriological and histopathological studies. *A. seminis* was not isolated in genital organs of the animals with the hormonal treatment, but it was found in the semen 15 days after the challenge, and, 3 out of 4 animals had suggestive lesions. In the group of lambs treated with ethylenglycol, only from one animal was positive to the isolation of *A. seminis* from the seminal gland and ampulla of the vas deferens. Isolation with in this group was negative to the epididymis tail tissue. In spite of the fact that the treatment induced lesions of foreign body type in all of them. In the animals without previous treatment challenged by placing bacteria into the urethra, bacteria were retrieved from the semen samples but not from the tissues. In more than half of the challenged animals independently of the treatment *A. seminis* was cultured from epididymis tail or accessory glands tissues. In some cases low intensity histopathological changes were associated with the presence of bacteria different to the ones used in the experiments, and they were mainly found in accessory glands. In the animals challenged IVD bacteria was isolated from the accessory glands, but not in the epididymis tail. The lesions induced by *A. seminis* and *B. ovis* in the epididymis tail were similar to both cases, characterized by epithelial mucosal hyperplasia, cystic formation, epididymal polymorphonuclear and lymphocyte cells infiltration and interstitial tissue fibrosis. Spermatic granulomas were observed in tail and head of some epididymis coinciding to bacterial growth and other without bacterial growth. Twenty six percent of *A. seminis* challenged animals (n= 5) were found positive to the Immunodiffusion test. Another twenty six percent showed suspected positive reactions. Six out of eight animals (75%) with *A. seminis* isolation showed inflammatory cells in semen. The fast disappearance of *A. seminis* in epididymis tail and its persistence in the accessory glands was probably due to a most intense inflammatory response in this first organ.

Key words: Epididymitis, lambs, *Actinobacillus seminis*, *Brucella ovis*, accessory glands, pathological, bacteriological.

INDICE

1.	Introducción	1
1.1	Antecedentes	2
1.2	Identificación de <i>Actinobacillus seminis</i>	3
	Pruebas bacteriológicas	3
	Inmunofluorescencia	4
	Pruebas serológicas	4
	Perfiles de proteínas de membrana externa	5
	Estudios genéticos	5
1.3.	Epidemiología	6
1.4.	Patogenia	9
1.5.	Patología	13
	Cuadro clínico	13
	Lesiones macroscópicas	14
	Lesiones microscópicas	14
1.6.	Diagnóstico	17
1.7.	Control y Tratamiento	19
2.	Justificación	21
3.	Hipótesis	22
4.	Objetivos	22
4.1.	Objetivo general	22
4.2.	Objetivos específicos	22
5.	Material y Métodos	23
5.1.	Bacterias	23
5.2.	Animales	23
5.3.	Inóculos de desafío	23
5.4.	Examen clínico	24
5.5.	Extracción de semen	24
5.6.	Evaluación del semen	25
5.7.	Manejo de las muestras del aparato reproductivo	25
5.8.	Análisis bacteriológico	25
5.9.	Producción de suero hiperinmune de conejo	26
5.10.	Pruebas de Inmunodifusión Doble en Agar (IDD)	26

6.	Experimento I - Inoculación intrauretral de <i>A. seminis</i> con tratamiento hormonal (GnRH) y traumático irritativo (etilenglicol).	28
6.1.	Material y métodos	28
6.2.	Resultados	31
6.2.1.	Examen clínico	31
6.2.2.	Serología y bacteriología de semen y órganos	33
6.2.3.	Patología macroscópica	36
6.2.4.	Patología microscópica	37
	Grupo 1 (THIU)	37
	Grupo 2 (TTIU)	39
	Grupo 3 (STIU)	40
	Grupo 6 (IE)	41
	Grupo 4 control (THSD)	43
	Grupo 5 control (TTSD)	43
6.2.5.	Estudio de semen	46
6.3.	Discusión	48
7.	Experimento II Inoculación intradefrente con <i>A. seminis</i> .	60
7.1.	Material y métodos	60
7.2.	Resultados	62
7.2.1.	Grupo de inoculación intradefrente, sin ligar.	62
	Bacteriología	62
	Histopatología	62
7.2.2.	Grupo de inoculación intradefrente ligado.	63
	Bacteriología	63
	Histopatología	64
7.3.	Discusión	67
8.	Experimento III - Inoculación intaepididimal con <i>A. seminis</i> y <i>B. ovis</i> .	71
8.1.	Material y métodos	71
8.2.	Resultados	73
8.2.1.	Grupo de inoculación con <i>B. ovis</i> .	73
	Examen clínico	73
	Serología y bacteriología de semen y órganos	73
	Hallazgos histopatológicos	74
8.2.2.	Grupo de inoculación inreaepididimal con <i>A. seminis</i> .	75

8.2.3	Grupo de inoculación intraepididimal conjunta con <i>A.seminis-B.ovis</i> -76	
	Examen clínico -----	76
	Serología y bacteriología de semen y órganos-----	76
	Hallazgos histopatológicos -----	77
8.2.4.	Examen de semen -----	82
8.3.	Discusión -----	84
9.	Confirmación de los aislamientos por PCR. -----	92
10.	Discusión general y conclusiones. -----	93
	Bibliografía -----	98
Anexos		
Anexo 1	Pruebas bioquímicas-----	103
Anexo 2	Extracción de ADN y PCR-ribotipo -----	105
Anexo 3	Soluciones -----	108

Lista de Cuadros

6.1. Experimento I, Alteraciones al examen clínico -----	32
6.2. Experimento I, Serología y aislamientos en semen y órganos-----	35
6.3. Experimento I, Grupo 1 (THIU) Bacteriología y Patología-----	44
6.4. Experimento I, Grupo 2 (TTIU) Bacteriología y Patología-----	44
6.5. Experimento I, Grupo 3 (SDIU) Bacteriología y Patología-----	44
6.6. Experimento I, Grupo 6 (IE) Bacteriología y Patología -----	45
6.7. Experimento I, Grupo 4 Control (THSD) Bacteriología y Patología-----	45
6.8. Experimento I, Grupo 5 Control (TTSD) Bacteriología y Patología-----	45
6.9. Experimento I, Estudio seminal-----	47
6.10. Experimento I, Resumen -----	56
7.1. Experimento II, Bacteriología y Patología-----	66
8.1. Experimento III, Alteraciones al examen clínico -----	79
8.2. Experimento III, Serología y aislamientos de semen y órganos-----	80
8.3. Experimento III, Bacteriología y Patología -----	81
8.4. Experimento III, Estudio seminal -----	83
8.5. Experimento III, Resumen-----	88

Indice de Figuras

Fotografias del Experimento I	57
Fotos 6.1 a 6.6.	58
Fotos 6.7 a 6.12.....	59
Fotografias del Experimento II	69
Fotos 7.1 a 7.6.....	70
Fotografias del Experimento III	89
Fotos 8.1 a 8.6.....	90
Fotos 8.7 a 8.12.....	91

ABREVIATURAS

μl	microlitros	M	molar
μm	micrómetros	min	minutos
°C	grados centígrados	mM	micromolar
ADN	ácido desoxiribonucleico	pb	pares de bases
Ag	antígeno	PCR	reacción en cadena de la polimerasa
cm	centímetros	pH	concentración de hidrogeniones
cm ³	centímetros cúbicos	pM	picomolar
CTAB	hexadecil trimetil bromuro de amonio	PMN	polimorfonucleares
FC	fijación de complemento	rpm	revoluciones por minuto
FSH	hormona folículo estimulante	seg	segundos
GnRH	hormona liberadora de gonadotropinas	SDS	duodecil sulfato de sodio
Gram (-)	negativo a la tinción de Gram	SSF	solución salina fisiológica
Gram (+)	positivo a la tinción de Gram	STIU	sin tratamiento previo desafío intrauretral
h	horas	THIU	tratamiento hormonal desafío intrauretral
HS	extracto salino caliente	THSD	tratamiento hormonal sin desafío
ID	intradeferente	TTIU	tratamiento traumático irritativo desafío intrauretral
IDD	inmunodifusión doble en agar	TTSD	tratamiento traumático irritativo sin desafío
IE	intraepididimal	U	unidades internacionales
IU	intrauretral	UFC	unidades formadoras de colonias
kb	kilobases		
LH	hormona luteinizante		
LPS	lipopolisacárido		

1. INTRODUCCION.

La epididimitis infecciosa en los carneros es considerada una enfermedad económicamente importante, por sus efectos adversos sobre la fertilidad (Walker *et al.* 1986; Appuhamy *et al.* 1998_a), la disminución en el número de reemplazos disponibles, el mayor número de carneros por hembra y los gastos que ocasiona el mantenimiento de hembras vacías (Genetzky, 1995). Esta patología ha sido primordialmente asociada a infecciones por *Brucella ovis* y *Actinobacillus seminis* y en menor grado a una gran variedad de microorganismos que incluyen *Histophilus ovis*, *Actinobacillus actinomycentemcomitans*, *Actinomyces pyogenes*, *Bacteroides spp.*, *Brucella abortus*, *Chlamydia psittaci*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Erysipelotrix rhusopathiae*, *Escherichia coli*, *Haemophilus somnus*, *Moraxella spp.*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas spp.*, *Salmonella abortus ovis*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* (De Long *et al.* 1979; Walker *et al.* 1986; Genetzky 1995).

B. ovis es reconocida como el agente causal más importante de la epididimitis en carneros, su epidemiología y patogenia está suficientemente documentada (Biberstein *et al.* 1964; Brown *et al.* 1973). Sin embargo existen evidencias de otros microorganismos como responsables o causantes de epididimitis en carneros, especialmente varios bacilos pleomórficos Gram negativos. La identificación de estos agentes se dificulta debido a la falta de uniformidad en la determinación de sus características bioquímicas y de metabolismo bacteriano *in vitro*. Los más frecuentemente reportados en estos aislamientos incluyen *A. seminis*, *A. actinomycentemcomitans*, *H. ovis*, *H. somnus*, *H. agni* y otras bacterias similares a *Haemophilus*. Otros aislamientos en casos de epididimitis incluyen *P. haemolytica* y *P. multocida* (Walker *et al.* 1986; Walker y Leamaster 1986).

La patogenia y los factores predisponentes de la epididimitis por *A. seminis* están poco estudiados. El trabajo indaga sobre la implicancia del tratamiento hormonal con GnRH y de la lesión del epidídimo en la ocurrencia de la enfermedad e intenta reproducir la patología inoculando el agente por distintas vías. También se realiza el estudio histopatológico comparativo de las lesiones del aparato reproductor luego de la inoculación con *A. seminis* y *B. ovis*. Se estudian las lesiones que ocurren en las glándulas anexas y se discute su importancia en los cuadros de epididimitis. Se realiza el seguimiento clínico y serológico de los animales desafiados. Esta investigación trabaja sobre algunos aspectos implicados en la patogenia de la enfermedad quedando muchos otros por resolver.

1.1. ANTECEDENTES

A. seminis ha sido aislado en casos de epididimitis, de muestras de semen y de epidídimo en Australia (Baynes y Simmons, 1960), Nueva Zelanda (Ekdahl *et al.*, 1968), Estados Unidos de Norte América (Livingston y Hardy, 1964), Sudáfrica (van Tonder, 1973), Reino Unido (Heath *et al.*, 1991), Kenia (Mbai *et al.*, 1996) y más recientemente en España (De la Puente Redondo *et al.*, 2000)

En México, existen reportes de casos de epididimitis por *A. seminis* desde 1986 (Trejo *et al.*, 1986), donde se aisló del epidídimo de un carnero del Estado de Hidalgo, posteriormente Oviedo *et al.*, (1988) aislaron el patógeno en carneros del Estado de México, en estos dos reportes la identificación del agente se logró por pruebas bioquímicas. Recientemente Méndez *et al.*, (1999) aíslan la bacteria y confirman el diagnóstico en pruebas de IDD con la utilización de antígenos sonicados, comprobando la existencia de identidad antigénica con la cepa de referencia (ATCC 15768).

A. seminis ha sido aislado de fetos abortados y de úteros posaborto en ovejas Dorper en Sudáfrica (van Tonder, 1973). Más recientemente se ha relacionado con abortos ocurridos dos semanas antes del comienzo de los partos en ovejas en el Reino Unido. Los fetos presentaban pocos cambios posmortem indicando que la muerte se produjo poco antes del mismo. En las placentas se encontraron amplias adherencias y necrosis caruncular, se descartaron otras causas de aborto (*Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Brucellas spp.*, *Clamidas* y *Toxoplasma*) y los aislamientos se lograron del contenido estomacal de los fetos (Foster *et al.*, 1999). Se le ha relacionado con casos de poliartritis y postitis en borregos (Watt *et al.*, 1970). También fue encontrado en semen normal de bovino (van Tonder y Bolton, 1970); y se le ha comunicado como causante de mastitis necrótica aguda luego de la inoculación intracisternal en ovinos (Watt *et al.* 1970; Alsenosy y Dennis 1985).

Baxendell, citado por Jackson y White (1982) señala a *A. seminis* como uno de los microorganismo de importancia en la producción de la epididimitis en caprinos, sin importar su condición, presentándose en machos adultos de cualquier edad.

Ekdahl *et al.*, (1968) aislaron microorganismos semejantes a *A. seminis* en el semen de muchos casos de epididimitis, pero no aislaron la bacteria de las lesiones en la necropsia, estos autores proponen que las lesiones encontradas pudieron ser provocadas por otros microorganismos, y que *A. seminis* se encontraría solo en las glándulas anexas. Sin embargo, el hallazgo repetido en semen de *A. seminis* y bacterias semejantes a *A. seminis*, sugiere fuertemente su papel en la etiología de la epididimitis tanto clínica como subclínica (van Tonder, 1979_a).

1.2. IDENTIFICACIÓN DE *Actinobacillus seminis*.

• **Pruebas bacteriológicas**

Desde su primer aislamiento realizado en 1960 por Baynes y Simmons, a partir de casos de epididimitis en carneros, *A. seminis* se describe como un bacilo pleomórfico, Gram negativo, de 1 μm x 1-4 μm , inmóvil y sin presencia de endoesporas. El crecimiento óptimo ocurre cuando es incubado en una atmósfera de 10 % de CO_2 y 37°C de temperatura, su crecimiento se ve favorecido con el agregado de sangre o suero. Luego de 24 horas se observan las colonias del tamaño de una cabeza de alfiler, a las 48 horas alcanzan un diámetro de 1-2 mm, poseen color gris blanquecino, convexas, redondeadas con márgenes enteros, a los cuatro días adquieren un diámetro mayor de 3 mm y muestran estriaciones radiales (Burgess, 1982). Las características bioquímicas de *A. seminis* incluyen ser catalasa positivo, oxidasa negativo, nitrato negativo, indol negativo y presentar pobre fermentación de la glucosa (Low *et al.*, 1995). En estudios de microscopía electrónica no se observan esporas, cápsulas ni pili en las cepas evaluadas (Spondenberg *et al.*, 1983).

Algunas cepas producen un pigmento amarillo limón en el paquete celular luego de la centrifugación, pero la mayoría presentan una coloración gris blanquecina luego de este procedimiento (Baynes y Simmons 1960; Stephens *et al.* 1983). No se desarrollan en agar MacConkey (Swanepoel, 1984). En la prueba de catalasa resultan usualmente positivas y son generalmente oxidasa negativas. La mayoría de las cepas no reducen nitratos a nitritos, pero puede ocurrir ocasionalmente (Bergey 1986; van Tonder 1979_b). No producen hemólisis (Bergey 1986; Cousins y Lloyd 1988), sin embargo algunas cepas presentan hemólisis incompleta (Swanepoel, 1984). La producción de ácido sulfhídrico detectado en tira de papel impregnado con acetato de plomo es negativa, pero pueden ocurrir reacciones leves. La degradación de los carbohidratos no ocurre luego de 14 días de incubación, en el caso de la glucosa, galactosa, glicerol, inositol, inulina, lactosa,

maltosa, manitol, manosa, rafinosa, sorbitol, sucrosa, trealosa, y xilosa. Algunas cepas presentan una baja producción de ácido luego de 28 días de incubación en medios con arabinosa, fructosa, manosa, y trealosa (Bergey, 1986). Las pruebas de Rojo de metilo y Voges Proskauer son negativas (Burgess 1982; Bergey 1986).

En la utilización del sistema APIZYM que es un método comercial semicuantitativo de identificación microbiológica, con el cual se evalúa la presencia de 19 reacciones enzimáticas, se constatan grandes similitudes entre *A. seminis* y *H. somnus*. La cepa de referencia de *A. seminis* (ATCC 15768) se caracteriza por resultar positiva a las siguientes reacciones del sistema: 2 (fosfatasa alcalina), 4 (estearasa, C4), 6 (Leucine arylamidase), 11 (fosfatasa ácida), 12 (fosfoamidasa) y 15 (β -glucoronidasa). Sin embargo un aislamiento de *A. seminis* estudiado por el mismo sistema, presentó las reacciones enzimáticas similares excepto la 4 (Groom *et al.* 1986; Cousins y Lloyd 1988).

- **Inmunofluorescencia**

Se ha desarrollado la técnica de inmunofluorescencia para la detección de *A. seminis* en semen, utilizando anticuerpos policlonales. Esta técnica es considerada por los autores altamente específica, lográndose la identificación del patógeno en forma clara, con la ayuda de su pleomorfismo característico (Ajai *et al.*, 1980).

- **Pruebas serológicas**

Las pruebas de inmunodifusión de *A. seminis* muestran reacciones cruzadas, por la presencia de antígenos comunes, con *H. haemoglobinophilus*, y los integrantes del grupo *Haemophilus* – *Histophilus* (*H. somnus*, *H. agni*, *H. ovis*) (Stephens *et al.*, 1983).

Las muestras de sangre de animales infectados experimentalmente muestran anticuerpos contra *A. seminis*, que fijan complemento a los 14 días posinfección con una persistencia de 35 días, los títulos mayores o iguales a 1:20 se consideran positivos, los títulos de 1:10 se consideran dudosos. También se encontró que los animales de los cuales se aisló *A. seminis* del semen, no presentaban títulos detectables por fijación de complemento (Baynes y Simmons, 1960).

Se han desarrollado pruebas de ELISA utilizando antígenos de *A. seminis* completo y sonificado. Los títulos obtenidos con el antígeno completo fueron menores que los obtenidos con las células sonicadas (Cárdenas y Maki, 1986). También se han desarrollado pruebas de ELISA empleando como antígeno el LPS, preparado por autoclavado y centrifugación (Tekes y Hajtos, 1990).

- **Perfiles de proteínas de membrana externa.**

En estudios de perfiles de proteínas de membrana externa por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) se encontró homogeneidad en las bandas de *A. seminis* (ATCC 15768) y un aislamiento de campo realizado en Australia, los perfiles de proteínas de membrana externa de *H. somnus*, *H. ovis* e *H. agni* fueron similares, pero no idénticos, a los de *A. seminis*, en cambio los perfiles de *H. haemoglobinophilus*, *H. influenzae* y *A. lignierensii* resultaron diferentes entre sí, y con los anteriores (Stephens *et al.*, 1983).

- **Estudio genético.**

Los estudios con enzimas de restricción (*Bam*HI), permiten realizar la diferenciación de *A. seminis* con el grupo H-H y también con *A. lignierensii*. Esta técnica ha permitido encontrar muy poca variación entre aislamientos de *A. seminis*, por lo que no resulta adecuada para estudios epidemiológicos. Las diferencias existentes con *A. lignierensii* podrían resultar un punto más a favor de su exclusión del género (Mc Gillivery y Webber, 1989).

La técnica de PCR se ha utilizado para realizar una identificación rápida de *A. seminis* y para establecer diferencias con otros géneros bacterianos. Así se tipificaron aislamientos de campo utilizando iniciadores de PCR ribotipo, elemento palindrómico extragenómico repetitivo (REP-PCR), consenso intragenómico enterobacterial repetitivo, (ERIC-PCR). De los 24 aislamientos de *A. seminis* estudiados se pudieron distinguir 5 tipos REP, 9 tipos ERIC y un solo patrón de ribotipo. Los patrones logrados con REP-PCR se denominaron como grupos del 1 al 5 presentando patrones repetitivos en las 275, 550, 600, 800, 1050 y 1100 pb; en el caso de ERIC-PCR los corrimientos presentan bandas similares en 300, 515 y 600 pb. En el caso del PCR ribotipo, los 24 aislamientos resultaron similares menos uno, estos se caracterizaron por poseer dos bandas de alta intensidad en 0.55 y 0.7 kb, y una de baja intensidad a 0.85 kb (Appuhamy *et al.*, 1998_a).

Todos los iniciadores generaron fragmentos de ADN discriminatorios y reproducibles, revelando la heterogeneidad de los aislamientos. Pudiendo ser el PCR-ribotipo de utilidad para diferenciar de otras especies (*H. somnus* e *H. ovis*) por la existencia de un patrón único, en cambio REP-PCR y ERIC-PCR que mostraron patrones complejos pero comunes, serían indicados para la realización de estudios epidemiológicos (Appuhamy *et al.*, 1998_a).

Posteriormente el equipo de Appuhamy *et al.*, (1998_b) desarrolló un PCR específico para *A. seminis*, diseñando iniciadores que amplifican una región del gene *rnmB* que es uno de los dos operones ribosomales caracterizados, que codifica para dos RNA de transferencia (tRNA-Ile y tRNA-Ala). Lo destacable de este diseño es que el PCR amplifica una banda única de 436 pb y no da productos de amplificación para *H. ovis*, *H. somnus*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. multocida*, *P. haemolytica* ni *E. coli* que son bacterias comunmente aisladas del aparato reproductivo de ovinos y bovinos. En cambio, el PCR-ribotipo, produce amplificación para algunas de estas bacterias, aunque con patrones diferentes de los de *A. seminis*, haciendo más difícil la interpretación.

1.3. EPIDEMIOLOGIA

Se ha observado prevalencia de epididimitis del 15 al 29% en carneros vírgenes de 6 meses a 1 año y medio de edad (Bulgin y Anderson, 1983). *A. seminis* puede provocar una pérdida de hasta el 20% de los posibles carneros reproductores durante el primer año de vida, aunque usualmente esta pérdida es algo más baja (Walker *et al.*, 1986). La incidencia encontrada por De Wet y Erasmus (1984) en borregos al alcanzar la pubertad, fue del 5.6%. Esta baja incidencia la atribuyen a que los animales del estudio provienen de producciones extensivas, ya que Jansen (1983) encuentra mayor incidencia en animales con altos niveles de nutrición en condiciones de confinamiento.

En estudios bacteriológicos realizados por Walker *et al.*, (1986) en carneros adultos y vírgenes de E.E.U.U., se constató que el 96.3% de los adultos con lesiones de epididimitis fueron positivos a *B. ovis*, mientras que *A. seminis* se encontró en el 75% e *H. ovis* en todos los aislamientos de los carneros vírgenes afectados.

Esta bacteria es considerada como causante de infertilidad en carneros del Reino Unido. Fue aislada en 3 de 16 carneros con lesiones genitales y pobre calidad de semen, con edades de 8 meses a 2 años y medio. Así mismo fue aislada en 2 de 96 animales fértiles, donadores de semen en programas de inseminación artificial, sin lesiones físicas y sin presencia de células inflamatorias en el semen, con edades de 8 meses y 6 años (Low *et al.*, 1995).

A. seminis fue aislado en el 13.8% de los carneros que no presentaron lesiones clínicas en el epidídimo ni en el testículo, ni neutrófilos en el semen, por lo que se consideró que la infección se encontraría en estado latente, adquiriendo estos animales, la condición de portador asintomático (van Tonder, 1979_a).

En estudios serológicos realizados en México, en los Estados de Hidalgo y México, en 6 explotaciones con un total de 111 carneros, se obtuvo una prevalencia del 9 % a la prueba de IDD con antígeno soluble de *A. seminis* (Méndez *et al*, 1999).

Bulgin y Anderson (1983) consideran dos cuadros de epididimitis, uno afectando a animales adultos en el cual el agente más frecuente es *B. ovis* y otro en animales vírgenes provocado por bacilos pleomórficos Gram negativos donde incluyen a *H. ovis*, *A. seminis*, otros *Actinobacillus* y *Haemophilus*. Por lo tanto caracterizan dos diferentes entidades patológicas, dependiendo de la actividad sexual del individuo. En el mismo sentido, estudios de prevalencia realizados en Utah (EE.UU.), indican que *B. ovis* fue el hallazgo más común en carneros pertenecientes a rebaños generales, en cambio se encontraron como más prevalentes los bacilos pleomórfico Gram negativos, en carneros vírgenes provenientes de rebaños de pie de cría, eso los lleva a concluir que se encuentran ante dos entidades patológicas, con diferentes agentes etiológicos y que se presentan bajo diferentes condiciones de manejo (Bagley *et al.*, 1985).

La epididimitis causada por *B. ovis* ocurre como infección enzoótica en los rebaños con animales portadores. Esta es más común en los grandes rebaños de campo que poseen un alto número de carneros mantenidos continuamente en contacto, siendo menos común en los pequeños rebaños, en donde es remplazada con mayor frecuencia toda la población de carneros. En contraste la epididimitis causada por bacilos pleomórficos Gram negativos, cuyo origen pueda deberse a una asociación entre estrés y condición hormonal; la remoción de todos los carneros afectados disminuye la incidencia de la enfermedad, pero no la elimina del rebaño (Bagley *et al.*, 1985).

La intervención de las hembras en la transmisión de la enfermedad no se encuentra claramente establecida. Sin embargo la detección de *A. seminis* en borregos luego del destete y la presencia del patógeno en las muestras cervicales en el 38% de las hembras en una explotación con problemas de epididimitis, sustenta la posibilidad de la transmisión a partir de la madre en el momento del parto (Heath *et al.*, 1991).

La transmisión oral a través de la leche es sugerida por Alsenosy (1985), ya que la bacteria fue encontrada en leche 9 días posinfección experimental, pudiendo resultar en una infección latente en los corderos. También se sugiere como medio de transmisión a la actividad homosexual cuando los carneros se aproximan a la pubertad, o la vía venérea durante la época de monta (Heath *et al.*, 1991).

Se encuentra descrita la alta incidencia de esta patología al alcanzar la madurez sexual (Simmons *et al.* 1966; Bagley *et al.* 1985), pero también se ha encontrado a *A. seminis* en carneros adultos, provocando alteraciones en el semen y baja fertilidad (Low *et al.* 1995; Mbai *et al.* 1996), adquiriendo un lugar relevante en esta categoría, cuando se controla *B. ovis* (van Tonder 1979^a; van Tonder 1979^c). Lozano (1986) sugiere la posibilidad de que ciertos individuos posean inmunidad natural contra la enfermedad.

1.4. PATOGENIA

Considerando los conocimientos actuales, con el objeto de llegar a un factor de predisposición común para la localización de microorganismos en el aparato genital, se podría citar los siguientes puntos relevantes:

- a) El prepucio del borrego está en contacto directo con la cama contaminada, cuando el animal se echa.
- b) Resultaría lógico considerar que un grupo de microorganismos con capacidad de provocar lesiones en distintas partes del cuerpo como, *Actinobacillus spp*; *H. somnus*; *Pastreurellas spp*; *Staphylococcus spp*, pueden tener acceso al huésped por una vía no hematológica (Jansen 1980_a; Jansen 1983).
- c) El desarrollo del tracto reproductivo, bajo control hormonal, define un medio adecuado para el desarrollo espermático y la sobrevivencia de los espermatozoides y puede resultar al mismo tiempo un medio apropiado para la multiplicación bacteriana y la extensión de las bacterias de la cavidad prepucial a las partes profundas del tracto reproductivo (Jansen, 1983).
- d) La presencia de traumatismos, es esgrimida como factor predisponente de la epididimitis (Baynes y Simmons, 1968), esta hipótesis resulta razonable considerando la posición, el tamaño y la localización de los testículos y de las colas del epidídimo, que los hacen un sitio de localización de lesiones traumáticas (Watt 1978; Bulgin *et al.*, 1990).

La actividad sexual y el desarrollo genital dependen de la concentración de las hormonas Luteinizante (LH) y Folículo Estimulante (FSH), liberadas por la Hipófisis, su producción es estimulada por la liberación pulsátil de la hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) producida por el Hipotálamo (Jansen, 1980_a).

Los andrógenos son producidos por las células de Leydig en respuesta a la estimulación pulsátil de la LH, esta juega un papel inicial dominante sobre el incremento de la actividad de la FSH y Prolactina en el estímulo de la espermatogénesis (Jansen, 1980_a).

La FSH también estimula a las células de Sertoli a producir y secretar la proteína unidora de andrógenos (ABP) que se une a los mismos e incrementa su concentración en los túbulos seminíferos. Parte de la testosterona que pasa a los tubos seminíferos es transformada en dihidrotestosterona (DHT) por la enzima 5 α - esteroide reductasa y parte de esta es transformada en estrógenos por la enzima aromatasa. Estos andrógenos

que son transportados por el flujo seminal hasta el epidídimo son necesarios para el desarrollo y función normal de las células epiteliales del epidídimo (Jansen 1980; Hafez 1993).

La función de las glándulas accesorias es dependiente de la producción de testosterona por los testículos, esta estimula la producción de fluido seminal y aumenta la concentración de fructosa, citrato y fosfatasa ácida en el mismo (Hafez, 1993).

Moore y Bedford (1979), demostraron que los espermatozoides de las ratas dependen de un medio adecuado, suministrado por el epidídimo, para su maduración y sobrevivencia y que mueren pocos días después de que el soporte androgénico del epitelio epididimal es afectado por la remoción de los testículos, presentándose cambios en las células epiteliales de la cola y la cabeza del epidídimo. Estas manifiestan actividad endocítica aumentada, desaparecen las vesículas del ápice de las células epiteliales, existe disminución del retículo endoplasmático rugoso y del aparato de Golgi e incremento del contenido de lisosoma, todo lo cual indica la reducción de la función secretora.

El líquido seminal en humanos y verracos, posee una fracción inmunosupresora que causa inhibición de la respuesta inmune celular y humoral. Dicha fracción posee prostaglandinas del grupo E y transglutaminasa que están implicados en la inmunosupresión que ocurre sobre las células NK y sobre la proliferación linfocitaria (Dostál *et al.* 1995; Dostál *et al.* 1997). Se menciona que este factor depositado en el recto, podría estar implicado en la transmisión del SIDA y de otras infecciones del aparato reproductivo (Dostál *et al.*, 1995).

Se ha hipotetizado que la producción de esteroides sexuales durante el desarrollo de la pubertad estaría implicada en la ocurrencia de la epididimitis, pero no existen estudios directos (Ley 1993; Bulgin y Anderson 1981).

También se ha hipotetizado que la lesión traumática del epidídimo, la subsecuente liberación de histamina y la colección de pequeñas cantidades de fluidos ricos en proteínas, favorecería la colonización de los microorganismos agravando el cuadro inflamatorio. En el mismo sentido estos traumatismos pueden causar la ruptura de los conductos epididimales, iniciando la formación de granulomas espermáticos mediados por factores autoinmunes sin la presencia de bacterias (Bulgin *et al.*, 1990).

La conformación prepucial ha sido mencionada como predisponente, los prepucios largos y pendulados están mas expuestos a traumatismos y podrían convertirse en puerta de entrada de microorganismos patógenos (Jansen, 1983).

La patogenia de la epididimitis es incierta, así Jansen (1983) sugiere que *A. seminis* es un microorganismo ambiental que invade la cavidad prepucial y es capaz de ascender hacia las partes profundas del tracto genital. Walker y Leamaster (1986) lo presentan como un habitante normal de la flora genital de machos y hembras que por razones "desconocidas" es capaz de provocar epididimitis en algunos individuos. Jansen (1983) establece que la infección se presenta en los animales jóvenes, más vigorosos y de mayor velocidad de crecimiento. Spondenberg (1983) describe un caso de epididimitis supurativa por *A. seminis* en un borrego en buena condición corporal.

Se constó la presencia de *A. seminis* e *H. ovis* en la mucosa del pene y vagina en animales jóvenes alrededor de los 6 meses, siendo los aislamientos más frecuentes que en borregos mayores de 2 años. Los aislamientos de estas bacterias comienzan a partir de las 12 semanas de vida, con un máximo a las 20 semanas, para luego caer al año de edad (Walker y Leamaster, 1986). Jansen (1980_a) estudió el papel del estado hormonal en la migración de los microorganismos de las partes superficiales del aparato reproductivo (mucosa peneana) a las profundas (epidídimo y testículo), basándose en los profundos cambios que se producen a nivel del aparato reproductivo durante el despertar de la pubertad, especialmente en las células del epitelio epididimal. El autor únicamente logró aislar *A. seminis* de la próstata, vesículas seminales y ámpula del deferente y en un caso de la cola del epidídimo, cuando inoculó la bacteria en el extremo de la uretra y realizó tratamientos con LH-RH. Sin embargo, Sponenberg (1983) menciona como poco probable la infección por vía ascendente, por no aislar el microorganismo en glándulas anexas en un caso clínico de epididimitis por *A. seminis*.

Baynes y Simmons (1968), reproducen cuadros de epididimitis clínica por introducción del agente en forma directa en el epidídimo. Van Tonder (1977) expuso borregos de 8 meses a infecciones masivas de *A. seminis*, por vía: rectal, oral, conjuntival, nasal, intravenosa y subcutánea, logrando la recuperación en semen de la bacteria, pero fallando en establecer el modo natural de transmisión de la enfermedad.

Persiste la duda si este agente se comporta como patógeno primario o se trata de un patógeno secundario, así por ejemplo en 5 de 6 animales con lesiones de epididimitis, libres de *B. ovis*, se aisló *A. seminis* combinado con *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Actinomyces pyogenes* (Mbai *et al.*, 1996). Lozano (1986) inoculó aislamientos de *A. seminis* provenientes de casos clínicos de epididimitis y trató de inducir la enfermedad por vía intravenosa y por mucosas sin lograr lesiones epididimales. Estos resultados lo hacen sugerir que las cepas utilizadas en el ensayo no serían agentes etiológicos primarios, y que éstas podrían actuar como oportunistas en caso de lesiones provocadas por otros agentes.

Las bacterias patógenas necesitan una relación fuerte y estable entre las adhesinas de la superficie bacteriana y los receptores celulares. Ciertos animales dentro de una especie poseen receptores específicos para adhesinas de bacterias patógenas como se ha establecido para *E. coli* (Sellwood *et al.*, 1975). Teniendo en cuenta que la capacidad de adhesión a mucosas es esencial para determinar la virulencia de muchas bacterias y significa el paso inicial en la patogénesis de muchas enfermedades, Hanley *et al.*, (1991) desarrollaron un modelo para comprobar la adhesión de *A. seminis* a células renales y la inhibición de la misma por el uso de anticuerpos policlonales, con resultados positivos. Por lo tanto es posible que *A. seminis* se adhiera al epidídimo por adhesinas de superficie que se asocien a los receptores específicos de las células epiteliales (Hanley *et al.*, 1991).

No existen reportes sobre la existencia de toxinas que sean responsables del cuadro clínico. En estudios recientes se encontró en extractos totales de *A. seminis* (corridos en geles de agarosa y sobre los cuales se aplicó la técnica de inmunotransferencia) la existencia de reacciones cruzadas leves, con las antitoxinas (monoespecíficas, policlonales) ApxI, ApxII, ApxIII, de *A. pleuroneumoniae*, a pesar que *A. seminis* no posee los genes que codifican para dichas toxinas. Esto podría indicar la producción de toxinas RTX, distintas a las Apx, en *A. seminis* (Shaller *et al.*, 2000).

Por otro lado *A. actinomicetencomitans* bacteria que se ha relacionado fuertemente con *A. seminis*, produce la leucotoxina (Ltx) responsable de apoptosis y necrosis de leucocitos. Esta integra la familia de las toxinas formadoras de poros (RTX) y juega un papel fundamental en la patogenia los cuadros clínicos desarrollados por la bacteria (Korostoff *et al.*, 1998).

1.5. PATOLOGÍA

- **Cuadro clínico**

La fase aguda de la enfermedad se extiende por 14 días pudiendo tener como desenlace la muerte del animal (Sponenberg 1983; Genetzky 1995). En algunos casos de orquitis severa y epididimitis se presenta pirexia, anorexia y depresión, ocasionalmente la infección es fatal. En otros casos, la infección se presenta solo en forma subclínica con la presencia de neutrófilos en el semen (Heath *et al.*, 1991).

Los carneros con epididimitis aguda y orquitis presentan el escroto inflamado y edematoso, usualmente en forma unilateral. A la palpación, el contenido escrotal se encuentra firme, inmóvil y las envolturas se encuentran adheridas pudiendo estar comprendidas la túnica y la piel (Ley, 1993). En algunos casos se produce la ruptura escrotal y la formación de fistulas que drenan el material purulento (Genetzky, 1995).

En casos crónicos se presentan abultamientos duros que pueden tener el tamaño de una pelota de golf y que se localizan en la cola o en la cabeza del epidídimo, el testículo presenta una significativa reducción de tamaño y cambios en su consistencia (Jansen, 1980_b).

- **Lesiones macroscópicas.**

El sitio de lesión más frecuente en casos de epididimitis en carneros maduros es la cola del epidídimo (86.4%). En borregos con edades que rondan el año, vírgenes, las lesiones fueron dos veces más frecuentes en la cola (58.9%) que en la cabeza del epidídimo (32.3%). Cuando la lesión se localizó en la cabeza del epidídimo el agente etiológico comúnmente no fue demostrado, correspondiendo en muchos casos a granulomas espermáticos, que podrían tener su origen en conductos eferentes aberrantes (Walker *et al.*, 1986).

Cuando se realiza la necropsia o la castración de carneros afectados en forma aguda, al incidir el escroto, el subcutáneo y la túnica vaginal se muestran marcadamente congestivos y edematosos. La túnica vaginal aparece adherida, congestiva y en muchos casos cubierta por depósitos de fibrina. En estos casos los testículos comúnmente se encuentran de tamaño normal y los epidídimos están agrandados y firmes (Baynes y Simmons 1960; Jansen 1980_b).

En los casos crónicos se observa fibrosis entre las capas parietal y visceral de la túnica vaginal. Usualmente el testículo sometido a procesos supurativos se encuentra disminuido de tamaño y adherido a la túnica albugínea, pudiendo presentar trayectos fistulosos que drenan al exterior. Al corte de la superficie se presentan zonas fibróticas y áreas de calcificación. Al examen de cabezas y colas del epidídimo, se pueden observar dos tipos diferentes de lesiones, unas con agrandamiento fluctuante de las colas epididimales, que al corte liberan exudado purulento grisáceo y otras con superficie dura al corte, debido a un aumento más o menos uniforme del tejido conectivo en el epidídimo (Baynes y Simmons 1960; Livingston y Hardy 1964; Jansen 1980_b).

Las vesículas seminales pueden presentarse aumentadas de tamaño, con una lobulación exageradamente aumentada. Sin embargo en muchas ocasiones se logran aislamientos bacterianos de las vesículas seminales y de las ámpulas del deferente con apariencia normal (Jansen 1980_b).

- **Lesiones microscópicas.**

En los estudios de las lesiones de epididimitis realizados por Jansen (1980_b) y Pérez *et al.*(1988), resultó imposible asociar el hallazgo histopatológico con una especie bacteriana determinada, por lo tanto un mismo tipo de lesión puede tener su origen en diferentes agentes bacterianos. No en todos los órganos en los que se encontraron bacterias se presentaron cambios histopatológicos, sin embargo las bacterias fueron halladas en glándulas accesorias, epidídimo o testículo en todos los carneros que presentaron cambios patológicos en alguna parte del aparato genital

- **Ampula del deferente**

En el epitelio y en la pared del ámpula del deferente se presentan una variedad de cambios patológicos; se observan áreas con descamación celular y necrosis caracterizadas por picnosis y citolisis. Además, se encuentran acumulaciones de neutrófilos tanto en el interior de los acinos como entre las células epiteliales. También se observan espermatozoides en la luz del ámpula. Puede haber acumulación de células plasmáticas en la lámina propia de los septos (Jansen 1980_b).

- Vesículas seminales

En las vesículas seminales es posible observar neutrófilos que se distribuyen en la lámina propia y entre las células del epitelio glandular. Los acúmulos de neutrófilos forman dilataciones por debajo del epitelio. En algunos casos se pueden encontrar acúmulos linfoplasmocitarios en la lámina propia de los septos glandulares. El epitelio puede tener zonas de hiperplasia, y en ocasiones zonas de necrosis (Jansen 1980_b).

- Epidídimo

Los cambios histopatológicos más importantes que se presentan en la mucosa del epidídimo incluyen: hiperplasia papilar, hiperplasia epitelial con formación de vesículas intraepiteliales, invaginación de células epiteliales algunas de las cuales forman bolsillos que son rodeados de tejido fibroso. En ocasiones se observa necrosis de epitelio epididimal y descamación celular que se acumula en la luz del conducto. Muchos de estos cambios ocurridos en el epitelio se acompañan del incremento del tejido fibroso en las áreas intertubulares (Baynes y Simmons 1968; Jansen 1980_b). Es posible observar células inflamatorias en la luz de los túbulos epididimarios e infiltración de células mononucleares en el epitelio y los intersticios formando de manguitos perivasculares (Trejo *et al.*, 1986).

Se observan en los cortes, sectores con acumulación de espermatozoides y otros en los cuales hay ausencia de los mismos, denotando la existencia de regiones obstruidas, que impiden el tránsito espermático (Jansen 1980_b; Trejo *et al.* 1986).

También es posible observar granulomas espermáticos compuestos por capas sucesivas de células gigantes de cuerpo extraño, macrófagos y linfocitos distribuidos entre el tejido conectivo fibroso, que se encuentran rodeando a masas de espermatozoides en diferentes etapas de degeneración (Baynes y Simmons 1960; Livingston y Harley 1964; Baynes y Simmons 1968; Jansen 1980_b; de la Puente-Redondo 2000).

- Testículos

Acúmulos de neutrófilos y linfocitos están presentes entre los espermatocitos y las espermatogonias en las lesiones agudas de orquitis. Las células inflamatorias también se infiltran en el tejido intersticial. Los espermatocitos, las espermatogonias, las células de Sertoli y células inflamatorias que se encuentran en los túbulos seminíferos y en el intersticio manifiestan picnosis, cariorrexis y cariólisis (Baynes y Simmons 1968; Jansen 1980_b).

En algunos casos las espermatogonias y espermatidas desaparecen y persisten únicamente las células de Sertoli. Hay linfocitos alrededor de los vasos y en el intersticio y se pueden observar células plasmáticas. También puede apreciarse incremento del tejido fibroso intersticial (Baynes y Simmons, 1968).

Las lesiones crónicas muestran un incremento del tejido fibroso en las áreas intertubulares con infiltración plasmocitaria. En suma, todas las células han desaparecido del tubo seminífero y su luz se encuentra ocupada por material amorfo y parcialmente calcificado (Baynes y Simmons, 1968).

- Semen

Comparando muestras de semen de carneros de un mismo rebaño, afectados y libres de epididimitis por *A. seminis*, se encuentra, una disminución del volumen del eyaculado en los afectados de 0.5 ± 0.23 contra 0.8 ± 0.17 ml en los negativos, con disminución en la concentración espermática de 260×10^6 /ml contra 1850×10^6 /ml. Los animales con epididimitis presentan anormalidades espermáticas en el rango de un 10 a 45 % contra un 3 a 9 % en los libres, la motilidad progresiva varía entre un 30 a un 80% contra un 82 a 94% en los animales libres, además el semen contiene gran cantidad de neutrófilos y células epiteliales en los animales afectados (Low *et al.* 1995; Mbai *et al.*, 1996)

En frotis de semen de carneros con epidídimos normales e infección en las vesículas seminales o ámpulas, algunas bacterias y neutrófilos se distribuyen entre los espermatozoides. Por otra parte, carneros con lesiones que ocluyen el tubo epididimario pueden además, presentar infección de la vesícula seminal o del ámpula, en estos casos no aparecen espermatozoides, pero sí neutrófilos y bacterias en sus muestras de semen (van Tonder 1977; Jansen 1980_b).

1.6. DIAGNOSTICO

El diagnóstico se debe basar en una correcta anamnesis, examen clínico, estudios serológicos, bacteriológicos y de semen (Baynes y Simmons 1968; Genetzky, 1995). Estos estudios deben realizarse en forma periódica, pero siempre se debe incluir un control durante la pubertad, y en animales en servicio, se debe incluir un estudio detallado dos meses antes de la época de monta y un estudio posterior a la misma (Ley 1993; Appuhamy *et al.* 1998_a).

En la anamnesis del caso se debe considerar principalmente, la edad de los carneros, convivencia de carneros adultos con jóvenes, el estado higiénico de los corrales, la entrada de carneros de reemplazo y de hembras, el número de carneros con lesiones y el sistema de monta. También se deben estudiar los parámetros reproductivos del establecimiento, poniendo énfasis en la fertilidad y en la ocurrencia de abortos.

El diagnóstico clínico debe incluir una detallada exploración del aparato reproductivo, es recomendable que el carnero sea sujetado en posición de "sentado". Se debe realizar una correcta observación del escroto poniendo atención en su simetría, la existencia de lesión a nivel escrotal, que puede ir desde la presencia de rubor y calor a la existencia de trayectos fistulosos (Otrowski, 1962). Luego se procede a la palpación del epididimo y los testículos. Los epidídimos se deben recorrer detalladamente comenzando por las colas, para luego continuar con los cuerpos y las cabezas. Se debe determinar si las colas son simétricas y la existencia o no de alteraciones en su superficie, posteriormente palpar los cuerpos que se encuentran en posición medial con respecto a los testículos, son difíciles de palpar y cualquier facilidad en su reconocimiento puede indicar la presencia de alguna alteración patológica. Por último palpar las cabezas con atención en la simetría y en la presencia de alteraciones en la superficie. Durante la palpación testicular se debe determinar la simetría y la consistencia testicular por lo menos en tres sectores: superior, medio e inferior. Desplazar los testículos en el escroto para comprobar la posible presencia de adherencias y realizar la palpación del cordón espermático. Por último extraer el pene y comprobar la integridad de su mucosa (Otrowski, 1962).

Es necesario realizar estudios serológicos periódicos, especialmente en rebaños afectados, para los principales agentes etiológicos de epididimitis (*B. ovis* y *A. seminis*). Se debe recordar que para el caso de *B. ovis* la seropositividad se presenta en forma errática en los animales infectados (Worthington *et al.*, 1985).

Se debe extraer semen por electroeyacuación, previa limpieza del prepucio y pene, depositándolo en bolsa o copa de colección estéril. La muestra obtenida se utilizará en estudios de calidad seminal como: motilidad de masa e individual, concentración espermática, porcentaje de anomalías en cabeza, cuerpo y cola, porcentaje de espermatozoides vivos y muertos (Low *et al.* 1995; Mabi *et al.* 1996). Se debe comprobar la presencia de células inflamatorias, en frotis directo de semen teñidos con Giemsa, también realizar tinción de Gram para comprobar la presencia de bacilos pleomórficos Gram negativos (Heath *et al.*, 1991). Al realizar estudios bacteriológicos del semen, se debe tener en cuenta que las bacterias no se eliminan de forma continua, por lo cual los muestreos deben hacerse en forma periódica, con el fin de incurrir en el menor número de errores diagnósticos (Beeman *et al.*, 1982).

Es conveniente castrar los carneros con lesiones para hacer estudios bacteriológicos e histopatológicos. Se debe tener en cuenta que las lesiones son progresivas e irreversibles. Se deben realizar siembras bacteriológicas de cola, cuerpo y cabeza del epidídimo así como de los testículos, éstas se deben hacer sobre medios ricos, con sangre o suero ya que muchas de las bacterias que causan epididimitis lo exigen. Se incubarán en aerobiosis y en condiciones microaerofílicas por un lapso de 7 días (Bulgin *et al.*, 1990). A las colonias sospechosas se les realizará frotis y tinción con Gram y Zielh-Neelsen modificado, tinción ésta, que permite distinguir entre *B. ovis* y *A. seminis* (van Tonder 1979_b; Burgess 1982). Se debe recordar que muchos microorganismos que causan epididimitis, al igual que *A. seminis*, son bacilos pleomórficos Gram negativos y son indistinguibles por su morfología (Walker *et al.*, 1986). Como paso siguiente se debe realizar la identificación por pruebas bioquímicas, en éstas se debe incluir: oxidasa, catalasa, reducción de nitratos, producción de indol, presencia de ureasa, utilización del citrato, oxidación y fermentación de azúcares, prueba de acriflavina, y utilización de ornitina y arginina. Las pruebas pueden no dar certeza en la identificación ya que muchas cepas presentan reacciones similares al grupo *Haemophilus-Histophilus*, además de existir variaciones entre las cepas de *A. seminis* (van Tonder 1979_b; Swanepoel 1984; Scanlan 1989).

A esta altura del diagnóstico podemos realizar el reconocimiento antigénico del aislamiento a través de la prueba de IDD, para lo cual se debe producir antígeno sonicado de la cepa aislada realizando la prueba contra un suero hiperinmune producido con la cepa de referencia, usando como control el antígeno sonicado de la misma (Méndez *et al.*, 1999).

Como forma de confirmar el diagnóstico realizado por las técnicas bacteriológicas clásicas se pueden utilizar técnicas de biología molecular, electroforesis sobre geles de agarosa de los extractos de proteínas totales o membrana externa (Stephens *et al.*, 1983), enzimas de restricción (McGillivray *et al.* 1986; McGillivray *et al.* 1989) o la técnica de PCR (Appuhamy *et al.* 1998_a; Appuhamy *et al.* 1998_b; Foster *et al.* 1999; de la Puente-Redondo *et al.* 2000)

1.7. CONTROL Y TRATAMIENTO

Bulgin (1990) ensayó métodos de control de epididimitis en borregos púberes basándose en la eliminación de todos aquellos borregos que presentaran lesiones epididimales, identificación de los agentes causales de las lesiones, producción de bacterinas trivalentes contra los principales agentes aislados (*Actinobacillus spp*, *H somnus* y *B. ovis*) y administración de antibióticos en el alimento. Estas bacterinas fueron aplicadas en programas que incluían vacunación y una o dos revacunaciones e inclusión en el alimento de 100 mg de sulfametazina y 150 mg oxitetraciclina/borrego/día por 4 meses. Se logró la reducción de los casos de epididimitis en todos los tratamientos: bacterina sola, bacterina y antibióticos y antibióticos solos. Sin embargo debe considerarse que el uso de antibióticos por tiempos prolongados puede traer como consecuencia la aparición de resistencia.

En la actualidad no existen vacunas comerciales para prevenir la epididimitis por *A. seminis* (Appuhamy *et al.*, 1998_n). Para el control de *B. ovis*, el uso de vacunas comerciales no es recomendado en los Estados Unidos de Norte América en todos los casos, porque no son completamente efectivas en prevenir y controlar la infección, interfieren con las pruebas diagnósticas y el incremento de la actividad inmunitaria exacerba las lesiones epididimales de los animales infectados (Genetzky, 1995). Algunos autores recomiendan el uso de bacterinas contra *B. ovis*, cuando la prevalencia de la enfermedad en el hato supera el 15% (Ley, 1993). Sin embargo, en Sudáfrica, en establecimientos en los que se realiza la vacunación en forma sistemática con cepa Rev.1 para control de *B. ovis*, esta deja de ser un problema, pasando a ser *A. seminis* preponderante en los animales con epididimitis clínica y subclínica (van Tonder, 1979_n).

Existen pocos reportes sobre el tratamiento de la epididimitis por *A. seminis*. Erasmus *et al.* (1982) realizan tratamientos con oxitetraciclina (Terramicina L.A laboratorio Pfizer) a dosis 1ml./10kg, recibiendo 5 inyecciones intramusculares cada 3 días sin obtener resultados favorables. Una vez desencadenada la repuesta autoinmune y la posterior formación del granuloma espermático poco se puede lograr con tratamientos antibacterianos.

La única medida de control que se realiza sistemáticamente contra la enfermedad, es la eliminación de los carneros que presentan lesiones clínicas o subclínicas, remplazo con animales libres de la enfermedad y provenientes de establecimientos libres, pero mientras no se conozca en forma más completa la patogenia y la epidemiología de la misma será difícil instaurar medidas de control efectivas (Appuhamy *et al.*, 1998_n).

2. JUSTIFICACION

De lo mencionado se puede concluir que actualmente no se tiene una cabal comprensión de los factores implicados en la patogenia y en la transmisión de la enfermedad, que sin duda tiene importancia económica y zootécnica al determinar la eliminación en los rebaños de pie de cría, de un gran número de carneros de reemplazo y de causar baja fertilidad en carneros adultos.

En este trabajo se busca establecer si las condiciones hormonales y las lesiones epididimales no infecciosas se encuentran implicadas en la patogenia de la enfermedad.

3. HIPOTESIS

Es posible reproducir la epididimitis por *A. seminis* por inoculación intrauretral e intradeferente del patógeno, existiendo diferencias en la susceptibilidad a la infección, entre los borregos sin tratamiento previo a la inoculación y aquellos sometidos a tratamiento hormonal (GnRH) y traumático-irritativo.

4. OBJETIVOS.

4.1. OBJETIVO GENERAL.

Determinar en borregos púberes vírgenes, sometidos a tratamiento hormonal y a tratamiento traumático-irritativo del epidídimo, la existencia de variaciones en la susceptibilidad a la infección por *A. seminis* inoculado por vía intrauretral e intradeferente.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- a) Intentar reproducir la enfermedad a partir de la inoculación de *A. seminis* por vía intrauretral, intraepididimal e intradeferente.
- b) Determinar si el tratamiento hormonal con GnRH influye en la migración y colonización de *A. seminis* a los diferentes sectores del aparato reproductor en borregos púberes vírgenes.
- c) Determinar si la lesión traumático irritativa del epidídimo contribuye a la instalación de *A. seminis* en el mismo.
- d) Evaluar las lesiones histopatológicas encontradas en los distintos sectores del aparato reproductivo de carneros inoculados, con *B. ovis* y *A. seminis*.

5. MATERIAL Y METODOS.

El trabajo se desarrolló en tres experimentos:

- Experimento I: Inoculación intrauretral de *A. seminis* con tratamiento hormonal (GnRH) y traumático irritativo (etilenglicol).
- Experimento II: Inoculación intradeferente con *A. seminis*.
- Experimento III: Inoculación intraepididimal con *A. seminis* y *B. ovis*.

La metodología utilizada en forma específica en cada experimento se describe dentro del capítulo correspondiente a cada uno de ellos. En este punto se describe la metodología y los materiales utilizados de manera común en todo el trabajo.

5.1. BACTERIAS DE DESAFIO

Se utilizó la cepa de *A. seminis* ATCC 15768 (Healey *et al.* 1985; Cardenas y Maki 1986; Healey *et al.* 1986; Healey *et al.* 1988; Scanlan *et al.* 1989) la cual fue obtenida originalmente del semen de borregos con epididimitis.

En los animales inoculados con *Brucella ovis* se utilizó la cepa Reo 198 independiente de CO₂ (Ficapal *et al.* 1998; Méndez *et al.* 1999).

5.2. ANIMALES

Se emplearon un total de 32 borregos de pelo, de 6 meses de edad, cuyo peso promedio al comienzo del experimento fue de 26.2 kg, provenientes de un rebaño sin antecedentes de la enfermedad. Se constató que todos los animales estaban libres de epididimitis, mediante el examen clínico, frotis e intento de aislamiento del semen. También resultaron negativos a la prueba serológica de doble inmunodifusión (IDD) para *A. seminis* y *B. ovis*.

5.3. INOCULOS DE DESAFIO

Los inóculos se prepararon a partir de cultivos sobre agar sangre de *A. seminis* y *B. ovis*, que se cosecharon a las 48h en solución salina fisiológica (SSF). Al inóculo se le realizó conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) por el método Miles *et al.* (1938).

5.4. EXAMEN CLINICO

Semanalmente, en el momento de la extracción de semen, se procedió a realizar el examen clínico del aparato genital, describiendo las posibles lesiones y su ubicación en el testículo y en el epidídimo. Se clasificaron en grados de lesión, desde una cruz a cuatro cruces, según el tamaño y simetría de las colas y cabezas del epidídimo, existencia de alteraciones en la superficie epididimal o en la consistencia y el tamaño testicular y/o dificultad en el desplazamiento del testículo y epidídimo en el escroto.

En el caso de las colas, cuerpos y cabezas del epidídimo, las alteraciones calificadas con una cruz representaron pequeñas variaciones en tamaño, con aumento en la consistencia del órgano o la presencia de rugosidades en la superficie; dos cruces representaron un aumento de tamaño entre el 50% y el 100%; tres cruces entre el 100% y el 300% y cuatro cruces mayor del 300%. En la valoración de los testículos dos cruces representaron una disminución del tamaño hasta el 25 % y tres cruces del 25% al 50 %. Es de hacer notar que en el examen clínico las alteraciones se describen en muchas ocasiones por su comparación con el testículo y epidídimo contralateral, por lo tanto pequeñas variaciones en un epidídimo pueden haber sido enmascaradas por la gran alteración en el epidídimo del otro lado y en igual forma por la presencia de cambios asociados en epidídimo y testículo.

5.5. EXTRACCION DE SEMEN.

La extracción del semen se realizó con electroeyaculador (transformador 12 VCT, 500 mA) previo lavado prepucial con agua estéril conteniendo 0.1% de cloruro de benzalconio y posterior secado con algodón estéril (van Tonder, 1979_a).

La técnica de electroeyaculación se basó en la descrita por Hafez (1993). Se sujetó al animal en decúbito lateral, se extrajo el pene y se mantuvo exteriorizado sostenido por una gasa colocada detrás del glande. Luego se introdujo el vástago lubricado con vaselina en el recto, aproximadamente 15 cm y se realizaron movimientos de masaje, los cuales consistieron en introducir y sacar el vástago ejerciendo presión sobre el piso de la pelvis. Se aplicaron pulsos de 10 seg aumentando el voltaje y entre pulso y pulso se dejó un tiempo de descanso de 10 seg.

El semen se recogió en bolsa estéril, se conservó y transportó al laboratorio en refrigeración, realizando de inmediato el frotis y la siembra.

5.6. EVALUACION DEL SEMEN.

El frotis de las muestras de semen, se fijó en metanol durante 3 min y se coloreó con Giemsa, para comprobar la existencia de bacterias y células inflamatorias y descamadas, así como anomalías espermáticas (Mbai *et al.*, 1996).

5.7. MANEJO DE LAS MUESTRAS DEL APARATO REPRODUCTIVO

A la necropsia o después de la castración, se colectaron las vesículas seminales, ámpulas del deferente, glándulas bulbouretrales, testículos y epidídimo (cola y cabeza), colocándolas en bolsas estériles, las que fueron mantenidas en refrigeración para realizar estudio bacteriológico en forma inmediata, dentro de las tres horas posteriores a la colecta. En todos los casos se tomaron fragmentos de tejido de 1 cm³ de cada órgano, que se fijaron en solución de Bouin (Molinolo *et al.*, 1983) para histopatología. Las muestras se mantuvieron 24h en solución de Bouin (Anexo 3), luego se hicieron tres cambios en alcohol 70%, se incluyeron en Paraplast -X TRA (Oxford- Labware, USA). Se realizaron cortes de 5 µm de espesor que se tiñeron con hematoxilina y eosina.

5.8. ANALISIS BACTERIOLOGICO.

- **Semen**

Para el examen bacteriológico de las muestras de semen se usó el medio agar sangre ovina 10%. La incubación de las muestras se realizó en una atmósfera con 10% de CO₂ hasta por 7 días, dependiendo del desarrollo bacteriano (Simmons *et al.* 1966; Heath *et al.* 1991). Se realizó tinción de Gram a las colonias sospechosas. Luego se procedió a identificar los aislamientos por características bioquímicas: catalasa, oxidasa, nitratos, indol, urea, producción de ácido sulfhídrico y utilización de la glucosa (Low *et al.*, 1995). Las pruebas bioquímicas se describen en el Anexo 1.

Se identificaron en forma definitiva las cepas sospechosas por la técnica de PCR, para lo cual se realizó la extracción del ADN. Se utilizaron los iniciadores para la determinación de patrones de ribotipo (Appuhamy *et al.*, 1998_a). Las técnicas de extracción de ADN y de PCR, así como los iniciadores se describen en el Anexo 2.

- **Muestras de tejido**

En el laboratorio de bacteriología se procedió a la siembra de las muestras tisulares, para lo cual se siguieron los siguientes pasos: se extrajeron con bisturi previamente flameado fragmentos de los órganos que se sumergieron en alcohol, para luego flamear su superficie sobre el mechero. Los fragmentos flameados se colocaron en bolsas estériles a las que se le agregó 1 ml de SSF estéril para proceder a la maceración. Por último se sembraron con hisopos estériles. se incubaron y se identificaron las colonias sospechosas, en la forma descrita para las muestras de semen.

5.9. SUERO HIPERINMUNE DE CONEJO

Se produjo un suero hiperinmune en conejo contra *A. seminis*, que fue utilizado como control positivo en las pruebas de IDD practicadas a los sueros de los animales experimentales.

El protocolo de inmunización consistió de cuatro inoculaciones, por vía subcutánea, una por semana (Rahaley, 1978). Se cultivó *A. seminis* durante 48h, se cosechó en SSF y se ajustó a una turbidez de 2 de la escala de Mac Farland. La primera inoculación se realizó con adyuvante completo de Freund y las otra tres con adyuvante incompleto de Freund. En todas las inoculaciones se utilizó 1ml de adyuvante y 1ml de la suspensión. Dos semanas después de la última inoculación se sangró por punción intracardiaca y se evaluó en diluciones dobles por inmunodifusión contra un antígeno soluble de *A. seminis*, obteniendo un título de 1:32.

5.10. PRUEBAS DE INMUNODIFUSION DOBLE EN AGAR.

Para realizar las pruebas serológicas de IDD para *A. seminis*, a los sueros obtenidos en los muestreos de los animales experimentales, se produjo un antígeno soluble utilizando la cepa de referencia (ATCC 15768). Esta se sembró en agar sangre, se incubó a 37°C en una atmósfera conteniendo 10% de CO₂ durante 48 horas, se cosechó en SSF estéril ajustando la concentración celular a una densidad óptica de 4.0 a 540 nm. La suspensión fue mantenida a 4°C por 24 horas, para luego someterla a centrifugación a 1000xg durante 15 minutos, el sobrenadante se empleó como antígeno soluble (Méndez *et al.*, 1999).

Las pruebas de IDD para *A. seminis* se corrieron sobre un gel de agarosa al 0.5% en PBS, pH 7.2, la lectura se realizó a las 72h (Méndez *et al.*, 1999). El sistema de inmunodifusión se conformó por 6 pocillos periféricos y uno central de 6 mm de diámetro, con una separación entre ellos de 3 mm. En el pozo central se depositaron 15µl de Ag y en los pozos circundantes se colocaron 17µl de los sueros problema y los controles positivo y negativo.

En forma semejante se corrieron pruebas de IDD para *B. ovis* con antígeno HS (de la sigla en inglés de: extracto salino caliente), sobre agarosa al 1%, con 11% de NaCl en 5 ml de amortiguador de borato (pH 8.3) y 95 ml de agua destilada (Nuñez y Díaz, 1998). En el pozo central se depositaron 12µl del antígeno HS y en los pozos circundantes se colocaron 16µl de sueros problema y controles positivo y negativo. Las lecturas se realizaron en ambos casos a las 24, 48 y 72h (Ficapal *et al.*, 1998)

6. EXPERIMENTO I

Inoculación intrauretral de *A. seminis* con tratamiento hormonal (GnRH) y traumático irritativo (etilenglicol).

6.1. MATERIAL Y METODOS

Se emplearon 18 borregos los cuales se distribuyeron en 6 grupos:

- Grupo 1: Tratamiento hormonal con desafío intrauretral de *A. seminis* (THIU): 4 borregos.
- Grupo 2: Tratamiento traumático-irritativo del epidídimo con desafío intrauretral de *A. seminis* (TTIU): 4 borregos.
- Grupo 3: Sin tratamiento previo y desafío intrauretral de *A. seminis* (STIU): 3 borregos.
- Grupo 4: Control con tratamiento hormonal, sin desafío intrauretral de *A. seminis*, con introducción de SSF en la uretra (THSD): 2 borregos.
- Grupo 5: Control con tratamiento traumático-irritativo del epidídimo, sin desafío intrauretral de *A. seminis*, con introducción de SSF en uretra (TTSD): 2 borregos.
- Grupo 6: Control con inoculación intraepididimal de *A. seminis* (IE): 3 borregos.

- **Ablación del proceso uretral**

A los animales de los grupos 1 al 5 se les realizó la ablación del proceso uretral, con el fin de lograr la canulación uretral y realizar la inoculación por esta vía. Para lo cual se procedió a extraer el pene sujetándolo por su base con una gasa. Se desinfectó el glande y se procedió al corte del proceso uretral con tijera. Posteriormente se realizó hemostasia por compresión con una torunda, por un lapso no superior a los cinco minutos.

- **Tratamientos previos al desafío**

- **Tratamiento hormonal** (grupo 1, grupo 4 control)

Previo al desafío o a la introducción de SSF intrauretral, a los borregos de estos grupos se les inyectó en forma intramuscular 0.5 ml Conceptal (Lab. Hoechst) durante 5 días, que contiene 2.1 µg de acetato de buserelin análogo sintético de la GnRH (Jansen, 1980₁₁). El desafío intrauretral se aplicó en coincidencia con el último tratamiento de GnRH.

- Tratamiento traumático-irritativo (grupo 2, grupo 5 control)

Se produjo una lesión en la cola del epidídimo izquierdo por inoculación de 0.4 ml de un irritante químico, etilenglicol. Se depiló, se desinfectó la piel y se aplicó el etilenglicol 24 h antes de la inoculación del patógeno por vía intrauretral.

- Sin tratamiento previo

El grupo 3 no recibió ningún tipo de tratamiento previo a la inoculación de desafío por vía intrauretral.

El grupo 6, de inoculación intraepididimal, tampoco recibió tratamiento previo al desafío.

- Inóculos y vías de inoculación

Los grupos 1, 2 y 3 recibieron por vía intrauretral, previa ablación del proceso uretral y utilizando un catéter de sondeo uretral para gato (3¹/₂ F.r Tom Cat Catheter, Sherwood-Medical, U.S.A Reorder No. 8890-703021), 2 ml de una suspensión de *A. seminis* en SSF estéril conteniendo 1.6×10^8 UFC/ml.

Los grupos 4 y 5 controles recibieron por vía intrauretral previa ablación del proceso uretral y por medio de catéter de sondeo uretral para gato, 2 ml de SSF estéril.

El grupo 6 control, recibió en forma directa en la cola epidídimo izquierdo (IE), previa higiene del escroto, 1 ml de la suspensión de *A. seminis* en SSF estéril con conteo bacteriológico de 1.6×10^8 UFC/ml.

- Manejo de los animales

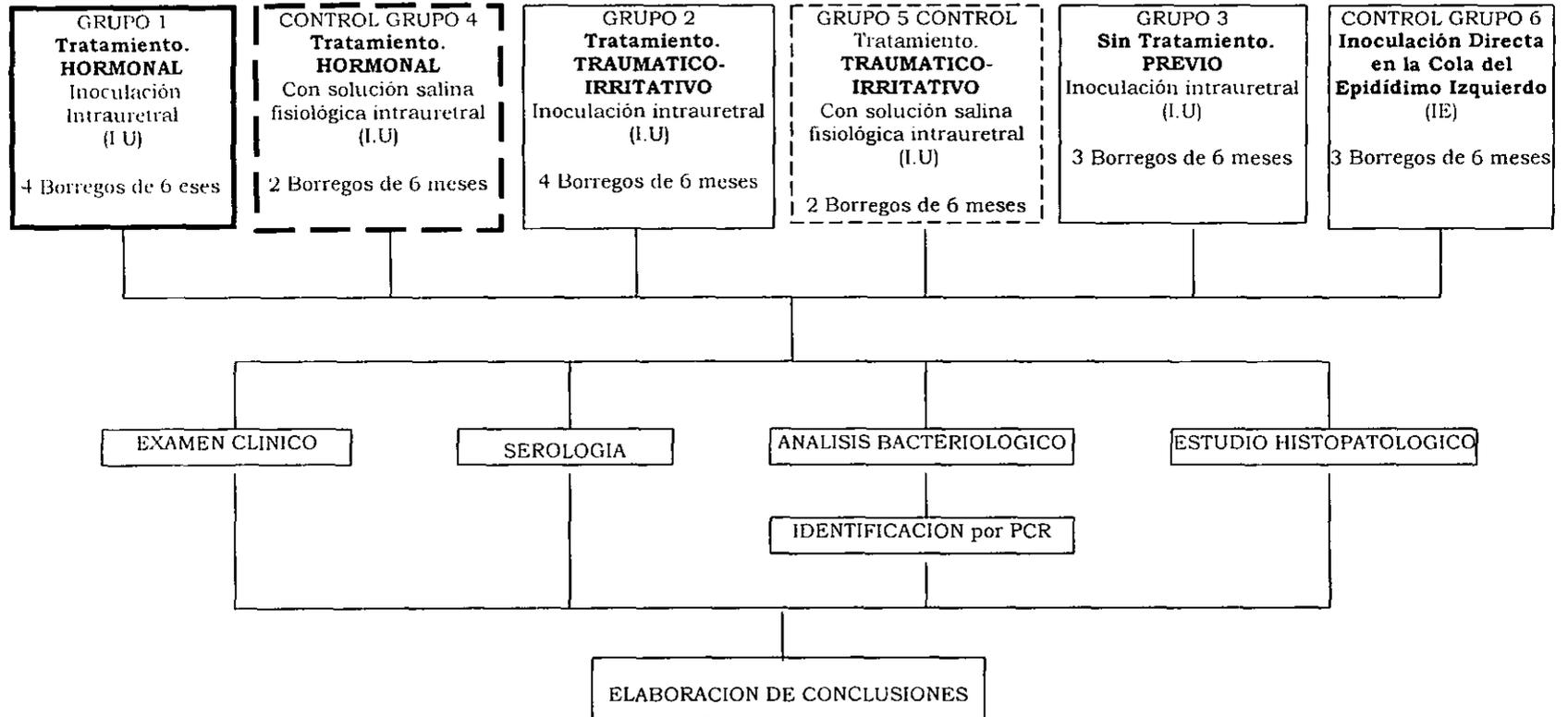
Luego de la inoculación, los borregos se mantuvieron aislados en corraletas individuales, para evitar la posible transmisión entre individuos.

Se tomaron cada 7 días muestras de sangre para IDD y de semen, a los animales de todos los grupos. Se realizó estudio seminal y bacteriológico.

Se sacrificaron los animales a los 35 días de ser inoculados, extrayendo las vesículas seminales, ámpulas del deferente, glándulas bulbouretrales, testículos y epidídimo (cola y cabeza) para realizar estudios de histopatología y bacteriología.

Experimento I

Diseño experimental



6.2. RESULTADOS

6.2.1. Examen clínico

Las observaciones clínicas se detallan en el Cuadro 6.1 (pag. 32).

En aquellos animales en que se inoculó la bacteria por vía intrauretral con tratamiento hormonal previo, grupo 1 (THIU) se constató alteración a partir de la 1ª semana posinoculación (PI) en dos borregos(859, 877), caracterizadas por induración de las colas epididimales izquierdas. En el borrego 859, en el último examen (5 semanas) se constató, en la cola del epidídimo izquierdo, induración y disminución del tamaño testicular, con una calificación de dos cruces. En el 877, se constataron alteraciones palpables consistentes en aumento de tamaño en la cola del epidídimo izquierdo y en la cabeza del epidídimo derecho junto al cuerpo, calificadas con dos cruces. En el animal 833, se encontró induración sin aumento de tamaño en la cabeza y cola del epidídimo izquierdo, que se apreciaron a partir de la cuarta semana y se calificaron con una cruz. En el animal 905, no se detectaron alteraciones, lo mismo que en los dos animales controles del grupo 4 (THSD).

En los epidídimos izquierdos de los borregos a los que se les introdujo etilenglicol para causar lesión, grupo 2 (TTIU) y sus controles del grupo 5 (TTSD), se presentó leve aumento de tamaño y de la consistencia de la cola del epidídimo, sin aumento de la temperatura local y con la presencia de rugosidades en la superficie epididimal, estas lesiones se clasificaron con una cruz.

En los borregos del grupo 3 (STIU), que no recibieron tratamiento previo a la inoculación intrauretral, no se detectaron alteraciones en el epidídimo.

En el grupo 6 (IE), a la semana de la inoculación intraepididimal de *A. seminis* se observó aumento de tamaño en las colas de los epidídimos de todos los borregos inoculados (930, 934, 938) a esto se sumó la dificultad en el desplazamiento de los epidídimos y testículos en la bolsa escrotal. En el caso de los animales 930 y 938 se comprobó rubor y aumento de la temperatura escrotal en el testículo ipsilateral a la inoculación presumiblemente debido a un cuadro de orquitis aguda, a los 14 días el rubor y el calor habían desaparecido, a los 28 días se apreció una disminución notable de la consistencia y del tamaño testicular.

Cuadro 6.1**Experimento I****Inoculación intrauretral de *A. seminis* con tratamiento hormonal (GnRH) y traumático irritativo del epidídimo (etilenglicol)****Alteraciones al Examen Clínico**

Tratamiento	n°	Localización de las alteraciones en el examen clínico
Grupo 1: Tratamiento con GnRH e inoculación Intrauretral con <i>A. seminis</i>	833	CEI+ y CaED+
	859	CEI++ y TI+++
	877	CEI++ y CaED++
	905	S.A
Grupo 4 Control: Tratamiento con GnRH y solución salina fisiológica Intrauretral	840	S.A
	906	S.A
Grupo 2: Tratamiento traumático- Irritativo e inoculación Intrauretral con <i>A. seminis</i>	843	CEI+ y CaEI+
	856	CEI+
	883	CEI+
	884	CEI+
Grupo 5 Control: Tratamiento traumático- Irritativo y solución salina fisiológica Intrauretral	896	CEI+
	897	CEI+
Grupo 3: Sin Tratamiento Previo e inoculación Intrauretral con <i>A. seminis</i>	932	S.A
	935	S.A
	941	S.A
Grupo 6: Inoculación Intraepididimal en la cola del epidídimo izquierdo con <i>A. seminis</i>	930	CEI++++ y TI++
	934	CEI+++ y TI++
	938	CEI+++ y TI+++

CEI - Cola Epidídimo Izquierdo
 CaEI- Cabeza Epidídimo Izquierdo
 CaED- Cabeza Epidídimo Derecho
 TI- Testículo izquierdo
 S.A sin alteraciones

Grado de lesión de+ a +++++

6.2.2. Serología y bacteriología de semen y órganos.

Los hallazgos serológicos y bacteriológicos en el semen y en los órganos se describen el Cuadro 6.2 (pag. 35).

En el grupo 1(THIU) en 2/4 borregos (859 y 877) se logró aislar *A. seminis* del semen, a la segunda semana de haberse inoculado. No se aisló la bacteria de los órganos del aparato reproductor de estos dos animales a la necropsia y se presentó seroconversión a la prueba de IDD en la 4ª y 5ª semana. En los borregos 833 y 905 no se lograron aislamientos del semen, de los órganos, ni seroconvirtieron a la prueba de IDD.

A pesar de no lograrse el aislamiento de *A. seminis*, otras bacterias fueron aisladas del aparato reproductivo. En el animal 859 se aislaron cocos Gram (+) en el testículo izquierdo, testículo derecho y ámpula del deferente. En el 833, cocos Gram (+) en las ámpulas del deferente, vesículas seminales, glándulas bulbouretrales y bacilos Gram (+) en la cabeza del epidídimo derecho y cola del epidídimo izquierdo. En el 877, bacilos Gram (+) en la cabeza del epidídimo derecho y cocos Gram (+) en la cola del epidídimo derecho y ámpula del deferente. En el animal 905, cocos Gram (+) en ámpula del deferente, vesículas seminales y glándulas bulbouretrales.

En el grupo 2 (TTIU) se aisló *A. seminis* de las vesículas seminales y de las ámpulas del deferente de un animal (856), en los otros 3 (843, 883, 884) no se lograron aislamientos de los órganos del aparato reproductor. Tampoco se lograron aislamientos del semen en ningún animal y solo en uno (856) se detectó una reacción serológica dudosa, en la 3ª semana posterior a la inoculación.

En los borregos 883 y 884 se aislaron cocos Gram (+) de las glándulas bulbouretrales, en tanto que de la cola del epidídimo derecho del primero, se aislaron bacilos Gram (+), y de la cabeza del epidídimo del segundo cocos Gram (+). Del borrego 843 no se lograron aislamientos del aparato reproductor.

En el grupo 3 (STIU) de los borregos 935 y 941 se lograron aislamientos de *A. seminis* del semen, a la 1ª semana en el 935 y a la 2ª y 5ª semana en el 941, en tanto que en el 932 no se lograron aislamientos de semen. En ninguno de los animales del grupo se lograron aislamientos de *A. seminis* de los órganos del aparato reproductor.

En lo que respecta a la serología se presentaron reacciones dudosas en la 1ª, 2ª y 3ª semana en el 935 y en el 941 se presentó a la 5ª semana. El animal 932 resultó negativo a la serología.

Se realizaron aislamientos de bacterias distintas de *A. seminis*. En el borrego 932, se encontraron bacilos Gram (-) en la cola del epidídimo izquierdo y en las vesículas seminales y cocos Gram (+) de la cola del epidídimo derecho y de las glándulas bulbouretrales. Del borrego 935 se aislaron bacilos Gram (+) de las glándulas bulbouretrales y del 941, cocos Gram (+) de la cola del epidídimo derecho y del ampulla del deferente bacilos Gram (-).

En el grupo 6 (IE) en el animal 930 se logró aislar *A. seminis* en los muestreos de semen de la 2ª, 4ª y 5ª semana post inoculación y de la cola del epidídimo izquierdo, vesículas seminales, ampullas del deferente y glándulas bulbouretrales. En el 938 se lograron aislamientos en el 1ª muestreo de semen y de las ampullas del deferente. En el animal 934 no se lograron aislamientos de las muestras de semen, ni de los órganos.

Con respecto a la serología, en el borrego 930, se observaron reacciones dudosas en la 1ª y 2ª semanas, haciéndose claramente positiva a la 3ª semana, para nuevamente observarse reacciones dudosas en la 4ª y 5ª semana. El animal 938 presentó reacciones positivas en el 1º, 2º, 3º, 4º y 5º muestreo. El 934 presentó reacciones dudosas en la 4ª y 5ª semana, a pesar de que no se logró aislar la bacteria del semen ni de los órganos del aparato reproductor.

Se aislaron además, cocos Gram (+) de la cabeza del epidídimo y testículo izquierdo del borrego 930 y de la cola del epidídimo izquierdo y del ampulla del deferente del 934. Se debe destacar el aislamiento de cocos Gram (+) de la cola izquierda del borrego 934 inoculado con *A. seminis*.

Los controles del grupo 4 (THSD) 840 y 906 resultaron negativos en los intentos de aislamiento de *A. seminis* y en la serología. Aislándose en el borrego 840 cocos Gram (+) de las ampullas del deferente, el 906 resultó libre de bacterias.

En los controles del grupo 5 (TTSD), borregos 896 y 897 no se logran aislamientos de *A. seminis* ni serologías positivas. Se aislaron bacilos Gram (-) de las ampullas del deferente y cocos Gram (+) de la cabeza del epidídimo izquierdo del 897, del otro animal control no se lograron aislamientos.

Cuadro: 6.2

Experimento I

Inoculación intrauretral de *A. seminis* con tratamiento hormonal (GnRH) y traumático irritativo del epidídimo (etilenglicol)

Serología y aislamientos en semen y órganos

Tratamiento	n°	Aislamientos de los órganos del aparato reproductivo									Aisla. de <i>A. seminis</i> en semen Semanas					Serología Semanas				
		Test. Izq	Cab. Izq	Cola Izq	Test. Der	Cab Der	Cola Der	Amp. Def	Ves. Sem.	Bulboure.	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª
Grupo 1: Tratamiento con GnRH e inoculación Intrauretral con <i>A. seminis</i>	833	-	-	BG+	-	BFG+	-	CG+	CG+	CG+	S					-	-	-	-	-
	859	CG+	-	-	CG+	-	-	CG+	-	-		A.s				-	-	-	+	±
	877	-	-	-	-	BG+	CG+	CG+	-	-		A.s				-	-	-	±	+
	905	-	-	-	-	-	-	CG+	CG+	CG+						-	-	-	-	-
Grupo 4 Control: Tratamiento con GnRH y solución salina fisiológica Intrauretral	840	-	-	-	-	-	-	CG+	-	-	S			S		-	-	-	-	-
	906	-	-	-	-	-	-	-	-	-		S				-	-	-	-	-
Grupo 2: Tratamiento traumático- Irritativo e inoculación Intrauretral con <i>A. seminis</i>	843	-	-	-	-	-	-	-	-	-					-	-	-	-	-	
	856	-	-	-	-	-	-	A. sem	A. sem	-					-	-	±	-	-	
	883	-	-	-	-	-	BG+	-	-	CG+					-	-	-	-	-	
	884	-	-	-	-	CG+	-	-	-	CG+					-	-	-	-	-	
Grupo 5 Control: Tratamiento traumático- Irritativo y solución salina fisiológica Intrauretral	896	-	-	-	-	-	-	-	-	-					-	-	-	-	-	
	897	-	CG+	-	-	-	-	-	BG-	-	S		S	S	S	-	-	-	-	-
Grupo 3: Sin Tratamiento Previo e inoculación Intrauretral con <i>A. seminis</i>	932	-	-	BG-	-	-	CG+	-	BG-	CG+		S			-	-	-	-	-	
	935	-	-	-	-	-	-	-	-	BG+	A.s				±	±	±	-	-	
	941	-	-	-	-	-	CG+	BG-	-	-	S	A.s	S	S	A.s	-	-	-	-	±
Grupo 6: Inoculación Intraepididimal en la cola del epidídimo izquierdo con <i>A. seminis</i>	930	CG+	CG+	A. sem	NA	NA	NA	A. sem	A. sem	A. sem	S	A.s	A.s	A.s	±	±	+	±	±	
	934	-	-	CG+	NA	NA	NA	CG+	-	-		S			-	-	-	±	±	
	938	-	-	-	NA	NA	NA	A. sem	-	-	A.s	S	S		S	+	+	+	+	+

CG+ Cocos Gram positivos
BG- Bacilos Gram negativos

S- sospechosas por ser bacilos pleomórficos descartadas por pruebas bioquímicas o por PCR
- aislamiento negativo

+ positivo a la IDD para *A. seminis*
- negativo a la IDD para *A. seminis*

6.2.3. Patología Macroscópica.

- Epididimo y testículo.

En el grupo 1(THIU) en el borrego 877, se detectó agrandamiento en la cola epidídimo izquierdo y en el sector superior del cuerpo del epidídimo derecho (Figura 6.1). En el animal 859 se apreció una disminución notable del testículo izquierdo adoptando este una coloración amarillenta con pérdida de la vascularización superficial (Figura 6.2). En los controles (grupo4-SDIU) no se observaron alteraciones.

En los animales del grupo 2 (TTIU) no se observaron mayores alteraciones salvo la induración al corte, del epidídimo inoculado. Los animales del grupo 5 control (TTSD) presentaron una alteración similar a los del grupo 2 (Figura 6.3).

Los animales del grupo 3 (STIU) no tuvieron alteraciones macroscópicas.

En el grupo 6 (IE), el animal 930, del que se aisló *A. seminis*, presentó un agrandamiento fluctuante del epididimo, con contenido amarillo verdoso al corte, con adherencias fibrinosas con la túnica vaginal, que también se observaron entre la túnica vaginal el testículo y el epidídimo en los animales 934 y 938 (Figura 6.4). En el caso de los animales 934 y 938 se observó en el punto de inoculación, una coloración pardo amarillenta de aproximadamente 2 mm de diámetro.

- Glándulas anexas.

A la observación macroscópica no se observaron alteraciones en las glándulas anexas de los borregos del experimento, salvo en las vesículas seminales del animal 856 del grupo 2 (TTIU) donde se presentó un puntillado blanco amarillento, de 1mm de diámetro, distribuido en la superficie y en el parénquima glandular (Figura 6.5).

6.2.4. Patología microscópica.

Los hallazgos histopatológicos se muestran correlacionados con los bacteriológicos en los Cuadros 6.3 al 6.8 (pag. 44 y 45).

- **Grupo 1 (THIU)** (Cuadro 6.3., pag. 44)

- Cola del epidídimo.

En el grupo 1 (THIU), en 3/4 borregos se observaron lesiones en las colas del epidídimo izquierdo. Las lesiones del 833 se caracterizaron por zonas de hiperplasia de la mucosa y cortes tubulares con espermatozoides compactados, sugiriendo trastornos en el tránsito espermático, coincidiendo en este caso con el aislamiento de cocos Gram (+). En el 859 se apreció hiperplasia y formaciones quísticas o de vesículas intraepiteliales en la mucosa, de forma circular limitadas por células epiteliales hipertróficas. En el 877 se observaron zonas de hiperplasia de la mucosa caracterizadas por el aumento de la celularidad del epitelio lo que determina la formación de eminencias que se proyectan en la luz del túbulo.

En 1/4 (877) se presentó alteración en la cola del epidídimo derecho, caracterizada por hiperplasia de mucosa, que se asoció con el aislamiento de cocos Gram (+) en la bacteriología.

- Cabeza del epidídimo.

En la cabeza izquierda del borrego 859 se constaron lesiones caracterizadas por disminución del espesor del epitelio epididimal, con cilios poco marcados y moderada infiltración linfocitaria. En la luz de los cortes del túbulo epididimal se encontraron espermátidas redondas, células multinucleadas de meiosis aberrante y macrófagos, que sugieren la ocurrencia de un proceso degenerativo a nivel testicular. Este borrego resultó negativo en la bacteriología.

En el borrego 877 la cabeza del epidídimo derecho se observó disminución del espesor del epitelio en sectores de la mucosa. Se observó también infiltración linfocitaria del intersticio, congestión, túbulos vacíos y con espermatozoides compactados. Se presentó un granuloma espermático de grandes dimensiones con presencia de fibrosis, linfocitos, macrófagos y células gigantes y una gran cavidad ocupada por espermatozoides compactados, de esta lesión se aislaron bacilos Gram (+).

- Testículo.

En el testículo izquierdo del borrego 859 se observó descamación y necrosis de las células del epitelio germinal en algunos túbulos seminíferos e infiltrado linfoide escaso en zonas del intersticio. Se presentaron signos claros de degeneración: escasas espermatogonias, células de Sertoli con citoplasma espumoso por la ausencia casi total de células germinales y células multinucleadas originadas por la ocurrencia de meiosis aberrantes o imperfectas (Figura 6.6). Estos hallazgos se asociaron con el aislamiento de cocos Gram (+). Del testículo derecho de este mismo borrego se aislaron cocos Gram (+) pero sin que se observaran lesiones al examen histopatológico.

El testículo derecho del borrego 877 presentó lesiones degenerativas focalizadas, túbulos con escasas espermatogonias y presencia de células multinucleadas de meiosis aberrantes, en este caso no se apreciaron infiltrados inflamatorios. La bacteriología resultó negativa.

- Ampula del deferente.

En la histopatología se encontraron infiltrados de macrófagos y linfocitos en 3/4 animales. La infiltración se caracterizó en el 833, por la presencia de linfocitos, plasmocitos y macrófagos en la submucosa del epitelio acinar que rodea el canal central del ámpula (Figura 6.7). En el 859 se presentó infiltración linfocitaria similar a la descrita para el 833 con la presencia de escasos macrófagos en la luz de los acinos alejados de la zona central. El 877 presentó infiltración linfoide focalizada leve del epitelio acinar. En el ámpula del deferente del 905 no se presentaron lesiones. De estos 4 animales se obtuvieron crecimientos bacterianos diferentes de *A. seminis* que correspondieron a cocos Gram (+).

- Vesícula seminal.

En la vesícula seminal del animal 833 se observó hiperplasia de mucosa e infiltración linfocitaria del epitelio con presencia de PMN en algunos acinos, aislándose cocos Gram (+) (Figura 6.8). En el animal 905 no se encontraron alteraciones en la histopatología pero se aislaron cocos Gram (+).

- Glándula bulbouretral.

En las glándulas bulbouretrales de este grupo no se encontraron lesiones histopatológicas pero se lograron aislamientos de cocos Gram (+) en los animales 833 y 905.

Concluyendo sobre las observaciones del grupo, se constata la presencia de gran cantidad de bacterias en el aparato reproductivo de estos animales. En algunos casos con presencia coincidente de epididimitis y aislamiento de bacilos Gram (+) y cocos Gram (+) (833 y 877), orquitis con cocos Gram (+) (859), ampulitis (833, 859, 877) y seminovesiculitis (833) con cocos Gram (+). Sin poderse demostrar la presencia de *A. seminis* en las lesiones.

- **Grupo 2 (TTIU)** (Cuadro 6.4., pag. 44)

- **Cola del epidídimo.**

En el grupo 2 (TTIU), en 3/4 colas izquierdas que fueron inoculadas con etilenglicol, pertenecientes a los animales 856, 883, 884, se observaron en los cortes tubulares hiperplasia y metaplasia de la mucosa epididimal. La metaplasia del epitelio epididimal se caracterizó por la pérdida de los cilios, apariencia de epitelio cúbico plano y cambio de orientación en los núcleos de las células del epitelio que se ordenaron en forma paralela a la membrana basal. Por otro lado el túbulo presentó compactación de espermatozoides, indicador de posible obstrucción en algún sector del mismo. En estos tres animales se observaron estructuras semejantes a granulomas de cuerpo extraño, con una región central caracterizada por la presencia de células gigantes, macrófagos y linfocitos rodeados por tejido fibroso (Figura 6.9). En la cercanía de estas zonas se observaron en abundancia manguitos perivasculares de células mononucleares.

El animal 841 presentó en la cola izquierda metaplasia e hiperplasia epitelial y cortes tubulares con espermatozoides compactados.

En las colas del epidídimo derecho no se encontraron alteraciones, salvo en el 856 en el cual se observó hiperplasia focalizada de la mucosa.

- **Cabeza del epidídimo.**

No se observaron lesiones en las cabezas epididimales en ningún animal del grupo, ni en el 856, del que se aislaron cocos Gram (+).

- **Testículo.**

En los testículos izquierdos de los borregos 856, 883, 884 ocurrieron cambios degenerativos del epitelio germinal, caracterizados por la pérdida de células germinales en algunos túbulos seminíferos.

- Ampula del deferente.

En las ámpula del deferente de los animales del grupo, en 1/4 se aisló *A. seminis* (856), en este animal se apreció una lesión caracterizada por escasa infiltración linfoide de la mucosa acinar. En los demás borregos del grupo no se encontraron lesiones y tampoco se lograron aislamientos bacterianos.

- Vesícula seminal.

En las vesículas seminales, se aisló *A. seminis* en el borrego 856, resultando negativos los primocultivos de los borregos 843, 883 y 884. En 3/4 animales del grupo, se encontraron lesiones histopatológicas, que se caracterizaron en el 856 por hiperplasia de mucosa e infiltración de PMN y linfocitos, localizada en algunos acinos, no se apreciaron infiltrados en el estroma glandular (Figura 6.10). En el animal 883, se encontró hiperplasia de mucosa y presencia focal de PMN intracinares. En el 884 se encontró hiperplasia de mucosa, sectores de epitelio modificado y descamación celular con escasa infiltración linfocitaria, en estos dos animales no se lograron aislamientos. Es de hacer notar en el borrego 884, la presencia de espermatozoides compactados en el interior de acinos glandulares.

- Glándula bulbouretral.

En las glándulas bulbouretrales de los animales del grupo no se encontraron lesiones histopatológicas, pero se lograron aislamientos de cocos Gram (+) en el 883 y en el 884.

- **Grupo 3 (SDIU)** (Cuadro 6.5., pag. 44)

Grupo 3 (SDIU). No se presentaron lesiones en epidídimos y testículos de los borregos del grupo.

- Ampula del deferente.

En el ámpula del deferente del animal 932 se encontró infiltración linfoide en la submucosa del epitelio acinar que rodea el canaliculo central, pero no se aisló ninguna bacteria (932) En los animales 941 y 935 se aislaron bacilos Gram (-) y cocos Gram (+) respectivamente, sin mostrar alteraciones patológicas.

- Vesícula seminal.

En las vesículas seminales del 932 se presentó descamación en la mucosa acinar, necrosis y la presencia focal de infiltrado mononuclear en parte del estroma, se aislaron bacilos Gram (-) (Figura 6.11). En los otros dos animales del grupo, 935 y 941 no se observaron lesiones ni se lograron aislamientos.

- Glándula bulbouretral.

No se encontraron lesiones en las glándulas bulbouretrales de los animales del grupo, a pesar del aislamiento de bacilos Gram (-) en el 932 y de cocos Gram (+) en el 935.

- **Grupo 6 (IE)** (Cuadro 6.6., pag. 45)

- Cola del epidídimo.

En el grupo 6 (IE), en la cola del epidídimo izquierdo del 930, se apreciaron cortes del túbulo vacíos y con hiperplasia de la mucosa. Se observó un granuloma con cápsula fibrosa, infiltración linfoplasmocitaria y PMN en su zona central, el aumento de tejido fibroso intersticial fue notorio y se recuperó *A. seminis* del órgano.

En la cola del epidídimo izquierdo del 934, se observó gran cantidad de espermatozoides, hiperplasia y metaplasia de la mucosa, con vesículas intraepiteliales, infiltración de PMN en la mucosa epididimal y presencia de los mismos en la luz tubular, congestión e infiltración linfocitaria en el intersticio. No se recuperó *A. seminis*, pero sí un coco Gram (+).

En la cola del epidídimo izquierdo del 938, se constató aumento del tejido fibroso intersticial, infiltración linfoide del intersticio, hiperplasia y metaplasia del epitelio tubular, con ausencia de espermatozoides en la luz del túbulo. No se aisló *A. seminis*.

- Cabeza del epidídimo.

En las cabezas de los epidídimos izquierdos de los borregos 930 y 934 no se observaron mayores alteraciones, salvo ligera hiperplasia de la mucosa en el 934. En el 938 se apreció leve infiltrado inflamatorio intersticial.

- Testículo.

En los testículos izquierdos de los borregos 930 y 934 se presentaron indicadores claros de degeneración, túbulos con escasas espermatogonias y espermatoцитos y otros con sólo células de Sertoli (Figura 6.12).

En el 938, además de los procesos degenerativos descritos, se constató la presencia de células multinucleadas de meiosis aberrantes en varios túbulos, con alteración del epitelio germinal e infiltración linfocitaria focalizada en el intersticio.

- Ampula del deferente.

En las ámpulas del deferente de los animales 930 y 938 de las que se aisló *A. seminis*, se presentaron lesiones caracterizadas por infiltración linfoplasmocitaria en el 930 y por infiltración de macrófagos y PMN e hiperplasia de la mucosa acinar en el 938. Estos infiltrados se ubicaron en la mucosa, debajo del epitelio que rodea la luz canalicular del ámpula y en la periferia acinar, en ambos animales. En el borrego 934 no se aisló *A. seminis* pero si un coco Gram (+) caracterizándose las lesiones por infiltración linfocitaria y presencia de vesículas en el epitelio.

- Vesícula seminal.

En las vesículas seminales del animal 930, del que se aisló *A. seminis*, se presentó hiperplasia de la mucosa, necrosis e infiltración de mononucleares en el epitelio acinar, sin que se presentaran infiltrados inflamatorios en el intersticio. En tanto en los animales 934 y 938 no se presentaron lesiones ni se realizaron aislamientos.

- Glándula bulbouretral.

Se aisló *A. seminis* de las glándulas bulbouretrales del borrego 930 sin que se encontraran lesiones histopatológicas. En los animales 934 y 938 no se presentaron lesiones ni se realizaron aislamientos.

- **Grupo 4 control (THSD)** (Cuadro 6.7., pag. 45)

- Cola del epidídimo.

En el grupo 4 control (THSD), en la cola del epidídimo izquierdo del animal 840, se observó leve hiperplasia de la mucosa, y cortes del túbulo rodeados de abundante tejido fibroso. Las colas del epidídimo del 906 no presentaron alteraciones.

Las cabezas de los epidídimos, los testículos, las ámpulas del deferente, vesículas seminales y glándulas bulbouretrales, no presentaron lesiones. Es de destacar la presencia de cocos Gram (+) en el ámpula del deferente del animal 840 sin que hubiera lesiones.

- **Grupo 5 control (TTSD)** (Cuadro 6.8., pag. 45)

- Cola del epidídimo.

En ambos borregos (896, 897) del grupo 5 control (TTSD), en las colas izquierdas del epidídimo, inoculadas con etilenglicol, se presentó moderada hiperplasia de la mucosa del epidídimo y túbulos con espermatozoides compactados. En la cola derecha de ambos animales no se registraron lesiones.

- Vesícula seminal.

En las vesículas seminales del animal 896 no se lograron aislamientos ni se presentaron lesiones en la histopatología, sin embargo del 897, del cual se aislaron bacilos Gram (-) largos, en la histopatología se observó en forma localizada, infiltración linfocitaria de la mucosa acinar y presencia de PMN en el interior de los acinos.

No se presentaron lesiones en las cabezas del epidídimo, testículos, ámpulas del deferente y glándulas bulbouretrales. De la cabeza del epidídimo izquierdo del 897, se aislaron cocos Gram (+) sin que hubiera lesiones.

Es de destacar que en las ámpulas del deferente en 8 de los 18 animales del experimento (840, 843, 859, 884, 896, 897, 905, 932), se encontraron espermatozoides en el interior de los acinos y en uno (884) se encontraron en las vesículas seminales.

Experimento I

Cuadro 6.3

Grupo 1 (THIU) Tratamiento hormonal (GnRH) con desafío de *A. seminis* intrauretral (IU)

Bacteriología y Patología

Tratamiento	n°	Organos del aparato reproductivo								
		Test. Izq	Cab. Izq	Cola Izq	Test. Der	Cab Der	Cola Der	Amp. Def	Ves. Sem.	Bulboure
Tratamiento con GnRH e inoculación Intrauretral con <i>A. seminis</i>	833	-	-	BG+	-	BFG+	-	BG+	CG+	CG+
	859	CG+	-	BG+	CG+	-	-	BG+	-	-
	877	-	-	-	-	BG+	CG+	CG+	-	-
	905	-	-	-	-	-	-	CG+	CG+	CG+

CG+ Cocos Gram positivos

BG+ Bacilos Gram positivos

BG- Bacilos Gram negativos

- aislamiento negativo



Degeneración testicular

Degeneración testicular e infiltración linfoplasmocitaria

Presencia de infiltrados inflamatorios (PMN, Linfocitos, Macrófagos)

Alteraciones en epitelio (Hiperplasia, Vesículas intraepiteliales, Metaplasia)

Granuloma espermático

Sin alteraciones patológicas

Cuadro 6.4

Grupo 2 (TTIU) Tratamiento traumático irritativo (etilenglicol) con desafío de *A. seminis* intrauretral (IU)

Bacteriología y Patología

Tratamiento	n°	Organos del aparato reproductivo								
		Test. Izq	Cab. Izq	Cola Izq	Test. Der	Cab Der	Cola Der	Amp. Def	Ves. Sem.	Bulboure
Tratamiento traumático-Irritativo e inoculación Intrauretral con <i>A. seminis</i>	843	-	-	BG+	-	-	-	-	-	-
	856	-	-	BG+	-	-	BG+	BG+	BG+	-
	883	-	-	BG+	-	-	BG+	-	BG+	CG+
	884	-	-	BG+	-	CG+	-	-	BG+	CG+

CG+ Cocos Gram positivos

BG+ Bacilos Gram positivos

- aislamiento negativo



Degeneración testicular

Lesión Granulomatosa de cuerpo extraño

Presencia de infiltrados inflamatorios (PMN, Linfocitos, Macrófagos)

Alteraciones en epitelio (Hiperplasia, Vesículas intraepiteliales, Metaplasia)

Sin alteraciones patológicas

Cuadro 6.5

Grupo 3 (SDIU) Sin tratamiento previo al desafío de *A. seminis* intrauretral (IU)

Bacteriología y Patología

Tratamiento	n°	Organos del aparato reproductivo								
		Test. Izq	Cab. Izq	Cola Izq	Test. Der	Cab Der	Cola Der	Amp. Def	Ves. Sem.	Bulboure
Sin Tratamiento Previo e inoculación Intrauretral con <i>A. seminis</i>	932	-	-	BG-	-	-	CG+	BG+	BG+	CG+
	935	-	-	-	-	-	-	-	-	BG+
	941	-	-	-	-	-	CG+	BG-	-	-

BG- Bacilos Gram negativos

CG+ Cocos Gram positivos

BG+ Bacilos Gram positivos

- aislamiento negativo



Presencia de infiltrados inflamatorios (PMN, Linfocitos, Macrófagos)

Sin alteraciones patológicas

Experimento I

Cuadro 6.6

Grupo 6 (IE):Desafío intraepididimal de *A. seminis* en la cola del epididimo izquierdo
Bacteriología y Patología

Tratamiento	n°	Organos del aparato reproductivo								
		Test. Izq	Cab. Izq	Cola Izq	Test. Der	Cab Der	Cola Der	Amp. Def	Ves. Sem.	Bulboure
Inoculación Intraepididimal en la cola del epididimo izquierdo con <i>A. seminis</i>	930		CG+	<i>A. sem</i>	NA	NA	NA	<i>A. sem</i>	<i>A. sem</i>	<i>A. sem</i>
	934			CG+	NA	NA	NA	CG+	-	-
	938				NA	NA	NA	<i>A. sem</i>	-	-

CG+ Cocos Gram positivos
 - aislamiento negativo



Degeneración testicular
 Degeneración testicular e infiltración linfoplasmocitaria
 Presencia de infiltrados inflamatorios (PMN, Linfocitos, Macrotagos)
 Alteraciones en epitelio(Hiperplasia, Vesículas intraepiteliales, Metaplasia)
 Sin alteraciones patológicas
 NA no analizado

Cuadro 6.7

Grupo 4 Control (THSD):Tratamiento hormonal(GnRH)sin desafío, con solución salina fisiológica intrauretral (IU)
Bacteriología y Patología

Tratamiento	n°	Organos del aparato reproductivo								
		Test. Izq	Cab. Izq	Cola Izq	Test. Der	Cab Der	Cola Der	Amp. Def	Ves. Sem.	Bulboure
Tratamiento con GnRH y solución salina fisiológica Intrauretral	840	-	-		-	-		CG+	-	-
	906	-	-	-	-	-	-	-	-	-

CG+ Cocos Gram positivos
 - aislamiento negativo



Alteraciones en epitelio(Hiperplasia, Vesículas intraepiteliales, Metaplasia)
 Sin alteraciones patológicas

Cuadro 6.8

Grupo 5 Control (TTSD): Tratamiento traumático irritativo (etilenglicol) sin desafío, con solución salina fisiológica intrauretral(IU)
Bacteriología y Patología

Tratamiento	n°	Organos del aparato reproductivo								
		Test. Izq	Cab. Izq	Cola Izq	Test. Der	Cab Der	Cola Der	Amp. Def	Ves. Sem.	Bulboure
Tratamiento traumático- irritativo y solución salina fisiológica Intrauretral	896	-	-		-	-	-	-	-	-
	897	-	CG+		-	-	-	-		-

BG- Bacilos Gram negativos
 CG+ Cocos Gram positivos
 - aislamiento negativo



Presencia de infiltrados inflamatorios (PMN, Linfocitos, Macrófagos)
 Alteraciones en epitelio(Hiperplasia, Vesículas intraepiteliales, Metaplasia)
 Sin alteraciones patológicas

6.2.5. Estudios de semen.

Los resultados se presentan en el Cuadro 6.9. (pag. 47).

En el grupo 1 (THIU), en ninguno de los muestreos de semen se presentaron PMN, a pesar de que en los animales 859 y 877 se aisló *A. seminis*. En los muestreos del borrego 877 se observaron células mononucleares de tipo macrófago.

En el grupo 2 (TTIU), en el animal 856, del cual se aisló *A. seminis*, se presentaron PMN en semen, lo mismo que en el 884, del que sin embargo no se aisló *A. seminis*.

En el grupo 3 (STIU) en los animales 935 y 941, en que se aisló *A. seminis*, no se detectaron PMN en las muestras, en cambio se observaron células mononucleares tipo macrófago.

En el grupo 6 (IE) en los 3 animales del grupo (930,934,938) se encontraron PMN en semen, en dos de estos (930 y 938) se aisló *A. seminis* del semen.

En el grupo control 4 (THSD), en los borregos 840 y 906 se presentaron PMN en 1 de 3 muestreos.

En el grupo control 5 (TTSD), en los borregos 896 y 897 no se encontraron PMN en las muestras de semen.

Otros hallazgos repetidos en los extendidos de semen en todos los grupos incluso en los controles, fueron la presencia de restos celulares y bacterias; estos resultados se muestran en el Cuadro 6.9.

Cuadro:6.9

Experimento I

Inoculación intrauretral de *A. seminis* con tratamiento hormonal (GnRH) y traumático irritativo del epidídimo (etilenglicol)

Estudio seminal

Tratamiento	n°	Estudio de frotis de semen					Aislamiento de <i>A. seminis</i> en semen
		PMN	Macrófagos.	Esperma	Restos celulares	Bacterias	
Grupo 1: Tratamiento con GnRH e inoculación Intrauretral con <i>A. seminis</i>	833	-	-	1/3	2/3	2/3	s
	859	-	-	-	3/3	1/3	
	877	-	1/4	-	2/4	1/4	A. s
	905	-	-	1/4	4/4	2/4	s
Grupo 4 Control: Tratamiento con GnRH y solución salina fisiológica Intrauretral	840	-	-	3/3	1/3	2/3	s
	906	1/3	-	-	1/3	1/3	s
Grupo 2: Tratamiento traumático- Irritativo e inoculación Intrauretral con <i>A. seminis</i>	843	-	-	-	3/4	1/4	
	856	1/5	1/5	-	4/5	1/5	s
	883	-	-	2/5	2/5	2/5	
	884	1/5	1/5	2/5	2/5	3/5	
Grupo 5 Control: Tratamiento traumático- Irritativo y solución salina fisiológica Intrauretral	896	-	-	-	2/3	1/3	
	897	-	-	-	3/3	1/3	s
Grupo 3: Sin Tratamiento Previo e inoculación Intrauretral con <i>A. seminis</i>	932	-	-	-	4/4	3/4	s
	935	-	2/4	4/4	-	1/4	A. s
	941	-	1/4	1/4	3/4	3/4	A. s
Grupo 6: Inoculación Intraepididimal en la cola del epidídimo izquierdo con <i>A. seminis</i>	930	2/4	1/4	2/4	-	2/4	A. s
	934	1/4	1/4	-	4/4	4/4	s
	938	2/4	2/4	-	1/4	4/4	A. s

positivos/n° de frotis realizados

s- sospechosas por ser bacilos pleomórficos descartadas por pruebas bioquímicas o PCR

6.3. DISCUSION

La discusión de este experimento puede ser seguida con la observación del Cuadro Resumen 6.10. (pag. 56).

En los animales del grupo 1 (THIU), no se logró aislar la bacteria de los órganos al sacrificio, sin embargo se lograron en dos animales, aislamientos de *A. seminis* del semen a los 15 días de la inoculación. Lo anterior sugiere que la bacteria logró colonizar el aparato genital en cantidad suficiente para mantenerse en él, ser eliminada y aislarse para luego desaparecer, secuestrarse o reducir su cantidad a niveles que imposibilitaron su aislamiento. En algunos reportes se comprueba por aislamiento la presencia de *A. seminis* en el semen, sin que existan lesiones palpables en los genitales, ni PMN en el semen (van Tonder, 1979_c, Low *et al.*, 1985). A pesar de no lograrse el aislamiento de *A. seminis* de los órganos, otras bacterias fueron aisladas del aparato reproductivo de los borregos de éste grupo, así como en los demás del experimento, incluidos los controles. Es de destacar que en muchos casos se encontraron lesiones sugestivas coincidentes con los aislamientos, mientras que en otras ocasiones, no se encontraron lesiones pero si se lograron aislamientos. Esto último puede deberse a que los flujos seminal y urinario que recorren el tracto genital pueden remover las bacterias, sin que necesariamente logren colonizar y desarrollar patología. Jansen (1980_b), determinó que no en todos los órganos donde se aíslan bacterias se presentan cambios histopatológicos y afirma que si se realiza el aislamiento de bacterias de las vesículas seminales, epididimo, testículo o en todos ellos, alguno de los sectores del aparato genital presentará cambios patológicos.

En otro trabajo realizado por el mismo autor, encuentra gran variedad de bacterias en el aparato reproductor de borregos provenientes de distintos establecimientos, sin la presencia de cambios patológicos a la palpación de los órganos genitales, ni PMN en el semen; aislando de las ámpulas del deferente bacterias similares a *P. haemolytica*, *H. ovis*, *C. pseudotuberculosis*, *Corynebacterium xerosis*, *Micrococcus varians*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphilococcus spp.*, *Acinetobacter*, de las vesículas seminales, bacterias similares a *P. haemolytica*, *C. pseudotuberculosis*, *M. luteus*, *Staphilococcus spp.*, *Acinetobacter*, de las colas del epididimo *P. haemolytica* *C. pseudotuberculosis*; de las cabezas del epididimo *P. haemolytica*, *C. pseudotuberculosis*, *Corynebacterium paurometabolicum*, *M. luteus*, *Acinetobacter* y *Arthrobacter flavescens*. En este experimento el autor no realizó la discriminación de género entre *Actinobacillus* y *Pasteurellas*, también observó diferencias entre carneros criados en forma intensiva y extensiva. Encontrando bacterias en algún sector del aparato reproductivo en 12 carneros

provenientes de explotaciones intensivas, mientras que en 12 provenientes de explotaciones extensivas, 7 presentaron distintas bacterias en el tracto y 5 resultaron libres (Jansen, 1983).

En el mismo sentido, Mbai *et al.*, (1996) lograron aislar de lavados uretrales de borregos sanos *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Actinomyces pyogenes*, *Bacillus spp.* y *A. seminis*. Searson (1982) aisló *E. coli* y *A. seminis* de las ámpulas del deferente y las vesículas seminales sin presencia de patología.

El objetivo de este trabajo no fue el estudiar en detalle la flora del aparato genital, sin embargo el hallazgo de bacterias diferentes a las inoculadas fue repetido. Esto puede deberse a las características de la explotación de procedencia de los animales experimentales: cría en corral, sobre pisos de tierra, con alta carga animal y medidas mínimas de higiene, estas condiciones pudieron ser favorables para el establecimiento de bacterias contaminantes en el prepucio y su posterior migración a las partes profundas del aparato reproductivo (Jansen, 1983). Otra razón de la existencia de gran variedad de bacterias, puede estar asociada a la manipulación y a la vehiculización de la flora presente en la uretra peneana hacia partes más profundas del tracto genital, al inocular *A. seminis* o introducir SSF por vía intrauretral.

Jansen (1980_a) realizó un tratamiento hormonal con GnRH similar al realizado en los grupos 1 y 4, en borregos de raza Dorper de 2 años. Encontrando que *A. seminis*, colocado en la uretra, migró y se aisló en los dos borregos tratados, en la próstata, vesículas seminales y ámpula del deferente y en uno de ellos alcanzó la cola del epidídimo. En éste experimento en los animales del grupo 2 no se pudo aislar la bacteria de los órganos del aparato reproductivo. La diferencia entre la experiencia de Jansen (1980_a) y éste trabajo, además de la raza y la edad de los borregos, estuvo en el momento de la inoculación, en el caso de Jansen (1980_a) 72h después del último tratamiento hormonal, en éste trabajo el día de la última inyección de hormona. También se diferenció en el conteo bacteriano de los inóculos que fue de 2.3×10^9 microorganismos por ml, mientras que en éste trabajo se utilizó un conteo de 3.21×10^8 UFC. Otra de las diferencias estuvo en la cepa utilizada, 0781 (van Tonder, Centro de Investigación Veterinaria de Grootfontein, Sudáfrica). Uno o varios de estos factores pudieron influir en la obtención de resultados no coincidentes.

El mismo autor, en un segundo experimento, utilizó 12 borregos Merino de un año de edad. Los colocó en un establo de piso de cemento, dejándolos por una semana sin realizar limpieza del corral, al término de la misma fueron colocados en pastoreo por otras dos semanas, en este momento realizó lavados prepuciales para conocer la flora

bacteriana presente en el prepucio. El grupo fue dividido en parejas de carneros que recibieron tratamientos hormonales que consistieron en seis inyecciones de 0.5 ml de Receptal, 1.0 ml de Receptal, 50 UI de PMSG y 150 UI de PMSG, a los 30 días se sacrificaron y se realizó la bacteriología los órganos del aparato reproductivo. El autor encontró que las bacterias presentes en el prepucio pudieron ser ubicadas en otros sectores del aparato genital con varios de los tratamientos, incluido el de 0.5ml de Receptal. En cambio en los tratados con 1.0 ml de Receptal, no se logró aislar a las bacterias de las glándulas anexas, ni del epidídimo. Este efecto, según el autor, pudo deberse a sobredosificación, ya que Aulcair *et al.*, (1977) encontraron una reducción de los receptores de LH/HCG en testículos de ratas tratados con un análogo de la LH-RH, este efecto es contrario al esperado con la utilización dosis adecuadas de dicha hormona. En este trabajo la posibilidad de sobredosificación puede ser la causa de que la bacteria no se halla recuperado de ningún sector del aparato reproductivo, sin embargo en tres de los borregos se presentaron alteraciones en los epidídimos, algunos con aislamiento positivo de bacterias diferentes de *A. seminis*. El tratamiento pudo favorecer la implantación de *A. seminis* y de otras bacterias, con la posible eliminación competitiva de *A. seminis* o la falla en su aislamiento, sugiriendo las lesiones su establecimiento original. La presencia de cocos y bacilos no necesariamente indica que sean los causantes de la lesión y es posible que hayan logrado establecerse en lesiones previas de otro origen, incluso producidas primariamente por *A. seminis*.

En el grupo 2 (TTIU) en el cual se produjo un traumatismo en el epidídimo (inyección de etilenglicol), no se logró aislar la bacteria de las colas del epidídimo lesionadas. Sin embargo, en el animal 856 se lograron aislamientos de las vesículas seminales y de las ámpulas del deferente, esto puede refrendar las observaciones de algunos autores sobre la presencia del patógeno en las glándulas anexas las cuales podrían actuar como recerborios de la bacteria en su pasaje hacia el epidídimo (Baynes y Simmons 1960, Simmons *et al.* 1966; Jansen 1980,; Heath 1991). En el borrego 856 se presentaron PMN en el semen, hallazgo que coincide con lo señalado por varios autores en animales que eliminan *A. seminis*, pero que no presentan lesiones de epididimitis (De Wet y Erasmus, 1984). Considerando que en ningún control se aisló a *A. seminis*, al menos en este animal, la inoculación intrauterebral permitió el asentamiento y permanencia de *A. seminis* en las glándulas anexas.

Cabría resaltar, que las lesiones en la cola del epidídimo izquierdo, donde se realizó el tratamiento traumático irritativo resultaron estériles. Las lesiones producidas se caracterizaron por grados leves de hiperplasia y metaplasia de la mucosa epididimal a formaciones granulomatosas de cuerpo extraño, con presencia de células epitelioides, macrófagos y fibroblastos sin presencia de PMN en todos los casos. Es posible que la intensidad de la respuesta inflamatoria haya impedido el establecimiento de *A. seminis* o su aislamiento desde las lesiones, sin embargo la ausencia de PMN en la lesión, es sugestivo de que las bacterias no se establecieron en el mismo.

En los animales del grupo 3, a los cuales se les inoculó *A. seminis* vía intrauretral sin tratamiento previo, no se obtuvieron cultivos positivos de *A. seminis* de los órganos reproductivos. Sin embargo, se logran aislamientos en semen en los animales 935 y 941. En estos dos animales llama la atención la ausencia de procesos inflamatorios en el aparato reproductivo analizado y lo más sobresaliente es que en el 941 la bacteria se logra aislar del semen en el último muestreo, a las cinco semanas posinoculación. Esto podría sugerir la permanencia de la bacteria en prepucio y en el extremo de la uretra o que se hubiera secuestrado en las glándulas anexas. Se debe recordar que en estos animales, el apéndice vermiforme fue amputado, lo que hace más factible la contaminación de la uretra con la flora prepucial y su posible arrastre al semen. Las células inflamatorias que se presentaron en el semen de estos animales fueron de tipo macrófago. La presencia de *A. seminis* como parte de la flora prepucial en borregos menores de un año, ha sido demostrada en estudios de Walker y Lea Master (1986). Mientras Mbai *et al.*, (1996) logran la recuperación de *A. seminis* en lavados uretrales, en animales con cultivos negativos de semen. En consecuencia las bacterias pudieron haber permanecido en el prepucio y uretra, sin penetrar a sectores profundos, ni producir lesiones significativas. En el mismo sentido van Tonder (1979_a), logró aislar *A. seminis* del semen de animales sanos, sin PMN y sin lesiones.

En el grupo 6 (IE), en el cual se inoculó *A. seminis* intraepididimal, en un borrego se recuperó *A. seminis* del punto de inoculación y de todas las glándulas anexas; en otro, de las ámpulas del deferente y en el tercero no se aisló, sin embargo, todos presentaron lesiones similares en el lugar de inoculación, semejantes a las comunicadas previamente por este procedimiento (Baynes y Simmons 1960; Livingston y Hardy 1964). En el ensayo de reproducción de la enfermedad por inoculación intraepididimal realizado por Baynes y Simmons (1960) en cuatro borregos, logran recuperar la bacteria en dos de ellos del

punto de inoculación, en otro del conducto deferente y en un animal no logran aislamientos al momento del sacrificio a los 60 días. En otro ensayo Livingston y Hardy (1964), en dos animales inoculados por vía intraepididimal logran recuperar a los 27 días el microorganismo en uno de ellos, a pesar de encontrar cambios patológicos en ambos. En este trabajo no se realizaron estudios de las glándulas anexas, lo que pudo resultar significativo, ya que poco antes del sacrificio, a los 21 días, se aisló *A. seminis* del semen del animal cuyos testículos y epididimos resultaron bacteriológicamente estériles. También Watt *et al.* (1970) inocularon aislamientos de *A. seminis* en dos borregos logrando recuperar la bacteria a los 8 días posinoculación, de la cola de los epididimos inoculados.

Los cambios clínicos en los animales del grupo 6 (IE) son también coincidentes con los señalados por Baynes y Simmons (1960), estos autores encontraron a la semana, agrandamiento de la cola del epididimo inoculada y del testículo ipsilateral, a los 21 días disminución de la inflamación con agrandamiento permanente de la cola, notando atrofia testicular a los 28 días en un caso y en otro la atrofia se hizo palpable a los 20 días.

Los hallazgos patológicos macroscópicos en epidídimo y testículo coinciden con los descritos por Livingston y Hardy (1964): adherencias entre la túnica blanca y la vaginal de la cola del epidídimo, que se extienden al cuerpo y al testículo, incluso la presencia de un absceso en uno de los animales de donde se logra aislar *A. seminis* (930).

Los hallazgos histopatológicos en testículos y epidídimos, fueron coincidentes con los encontrados en las reproducciones experimentales de la enfermedad y en los casos de campo por otros autores (Baynes y Simmons 1960; Livingstone y Hardey 1964; Baynes y Simmons 1968; Erasmus *et al.* 1982; Trejo *et al.* 1986; Heath *et al.* 1991; Mbai *et al.* 1996; de la Puente Redondo 2000).

No se observaron alteraciones macroscópicas en las glándulas anexas en ningún grupo, incluso en ámpula del deferente, glándula bulbouretral y vesícula seminal de los borregos del grupo 6, de los que se aisló *A. seminis*, la única excepción fue la vesícula seminal del animal 856, grupo 2 (TTIU), de la cual también se aisló *A. seminis*.

La presencia de infiltrados inflamatorios rodeando al canal central del ámpula del deferente en los borregos 930, 938, 856 de los que se recuperó *A. seminis* y del 833 del que se aisló un coco Gram (+), sugiere la respuesta a las bacterias o a sus antígenos presentes en la luz canalicular (Foster *et al.*, 1987).

El hallazgo de pequeños infiltrados linfoides en las ámpulas del deferente, fue descrito por Foster *et al.*, (1987), en sus controles libres de *B. ovis*. Este tipo de infiltrados

estuvo presente en las ámpulas del deferente en los borregos 859, 877, 934 de los que se aislaron cocos Gram (+), y en el 932 libre de bacterias, pertenecientes a grupos con diferentes tratamientos, lo que sugiere una respuesta crónica ya sea a componentes seminales o a las bacterias presentes en el semen. Esto puede estar relacionado con el hallazgo de espermatozoides en gran número en los acinos de las ámpulas del deferente (8:18) y en una vesícula seminal, que pueden explicarse por reflujo seminal que podría determinar también el movimiento ascendente de bacterias (Jansen 1980_b; Foster *et al.* 1987).

Los hallazgos histopatológicos en las vesículas seminales se caracterizaron, en todos los casos, por una respuesta inflamatoria distribuida focalmente en el parénquima glandular y localizada a nivel epitelial con hiperplasia, descamación celular y necrosis, acompañada por infiltración linfocítica y por la presencia de escasos PMN en el interior de los acinos. No se observó la presencia de acúmulos de células mononucleares en el estroma glandular, salvo en el 932, los cuales coexistieron con profundos cambios en el epitelio acinar. Este tipo de respuesta fue encontrado en aquellos animales en los que se recuperó *A. seminis*, así como cocos Gram (+) o bacilos Gram (-). La localización de estas lesiones es acorde con la inoculación del patógeno a través de la uretra, por reflujo seminal y/o ascenso desde el prepucio. A este respecto Foster *et al.*, (1987), sugieren para el caso de *B. ovis*, la llegada de la bacteria por vía hemática por la respuesta inflamatoria detectada en el estroma, no observando cambios notables a nivel epitelial, aunque no descartan el posible ascenso de las bacterias desde el prepucio.

Las glándulas bulbouretrales no presentaron lesiones histopatológicas, a pesar de la recuperación de *A. seminis* y otras bacterias en varios animales. En estudios de campo de epididimitis por *B. ovis*, se lograron 4 aislamientos de estas glándulas contra 41 y 28 de las ámpulas del deferente y vesículas seminales (Searson, 1986). Por otro lado, llama la atención que Foster *et al.*, (1987) tampoco encuentran en la histopatología diferencias entre los borregos infectados por *B. ovis* (n=25) y los controles libres (n=15), demostrando consistentemente células plasmocitarias, sin diferencias entre los dos grupos.

Los hallazgos histopatológicos en glándulas anexas, coinciden con los descritos por Jansen (1980_b) en casos de epididimitis provocados por agentes diferentes de *B. ovis* y con los descritos por Foster *et al.*, (1987) para esta bacteria, a excepción de las vesículas seminales.

Los resultados de la serología en el experimento I mostraron reacciones positivas en 2/3 animales inoculados por vía intraepididimal y en 2/11 de los inoculados por vía intrauretral. Se encontraron reacciones dudosas en 2/3 de los inoculados por vía intraepididimal y en 5/11 de los inoculados por vía intrauretral, estas reacciones dudosas se caracterizaron por poseer bandas de muy leve intensidad o no coincidentes en forma total con la banda producida por el suero control de conejo. En estudios realizados por Méndez *et al.*, (1999) se describieron reacciones cruzadas caracterizadas por bandas de precipitación, pero no de identidad con *H. somnus* y *P. haemolytica*. Se debe destacar que los sueros de los animales resultaron negativos en los exámenes previos al desafío experimental.

Se encontraron reacciones claramente positivas, a partir de los 7 días, en un borrego del grupo de inoculación intraepididimal y en otro a la 3ª semana. Mientras en los animales inoculados por vía intrauretral se obtuvieron reacciones positivas en las semanas 4ª y 5ª. Otros autores han demostrado en tres de cuatro animales, infectados experimentalmente por vía intraepididimal y mediante la técnica de fijación de complemento, resultados positivos a los 14 días de la inoculación (Baynes y Simmons, 1960) pero esta seropositividad cayó rápidamente hacia los 35 días post infección. En pruebas de ELISA, utilizando LPS se lograron detectar anticuerpos a los 11 días de la inoculación por vía intraepididimal (Tekes y Hajtos, 1990).

Algunos animales que eliminan *A. seminis* en semen pueden resultar negativos a la prueba de FC (Simmons *et al.* 1966; Baynes and Simmons 1968), esto también fue observado para la prueba de IDD con antígeno soluble (Méndez *et al.*, 1999). Solamente un 15% de los borregos que eliminan *A. seminis* en semen resultan positivos a la prueba de ELISA con LPS (Tekes y Hajtos, 1990). La baja detección de los casos subclínicos, en las pruebas serológicas puede ser atribuida a la ausencia de una respuesta humoral persistente y fuerte de tipo IgG, debido a la producción de un proceso inflamatorio local e intracanalicular de baja intensidad con ausencia de bacteremia. (Jansen y Haynes, 1984).

No existen estudios directos sobre la presencia de una fase bacterémica en esta infección. La ausencia de bacteremia en la epididimitis por *A. seminis*, podría ser sustentada en la imposibilidad de aislar *A. seminis* del hígado y del bazo (Baynes y Simmons, 1960) o en el ensayo de inoculación en la cisterna mamaria de ovejas, realizado por Alsemosy y Dennis (1985), en el que inducen mastitis necrótica, recuperando *A. seminis* de la glándula mamaria a los 9 días. pero fallan en la recuperación de la bacteria

de sangre, corazón, hígado, pulmón, riñones, articulaciones, útero y cerebro. Sin embargo, existen reportes de *A. seminis* como causante de poliartritis e infecciones respiratorias, pero la identificación bioquímica de esos aislamientos resulta dudosa, pudiendo haber sido confundido con *H. ovis* (Watt *et al.*, 1970). Por otro lado los trabajos de Jansen (1980_a, 1983) explican la llegada de las bacterias, *A. seminis* u otras, a los distintos sectores del aparato reproductivo, por el ascenso desde el prepucio y la uretra, hasta los testículos y epidídimos, mediante flujo seminal retrógrado con ausencia de bacteremia.

Cuadro:6.10

Experimento I

Inoculación intrauretral de *A. seminis* con tratamiento hormonal (GnRH) y tratamiento traumático irritativo del epidídimo (etilenglicol)

Resumen

Tratamiento	n°	Aislamiento de <i>A. seminis</i> de los órganos	Aislamiento de <i>A. seminis</i> . semen	Presencia de (macro yPMN) en semen	Serología	Bacteriología y Patología de los órganos del aparato reproductivo									Localización de las alteraciones en el examen clínico
						TI	CaEI	CEI	TD	CaED	CED	AD	VS	BU	
Grupo I GnRH <i>A. seminis</i> IU	833		s	-	-	-	-	BG+	-	BFG+	-			CG+	CEI+ y CaED+
	859		A.s	-	+				CG+	-	-				CEI++ y TI+++
	877		A.s	+	+				BG+						CEI++ y CaED++
	905		s	-	-	-	-	-	-	-	-	CG+	CG+	CG+	S.A
Grupo 4 Control GnRH-SSF IU	840		s	-	-	-	-		-	-		CG+	-	-	S.A
	906		s	+	-	-	-		-	-		-	-	-	S.A
Grupo 2 Traumático- Irrit <i>A. seminis</i> IU	843			-	-	-	-		-	-		-	-	-	CEI+ y CaEI+
	856	V S,AD	s	+	±				-	-					CEI+
	883			-	-	-	-		-	-	BG+			CG+	CEI+
	884			+	-	-	-		CG+	-	-			CG+	CEI+
Grupo 5 Control Traumático- Irrit SSF	896			-	-	-	-		-	-		-	-	-	CEI+
	897		s	-	-	-	CG+		-	-					CEI+
Grupo 3 Sin Tratamiento Previo <i>A. seminis</i> IU	932		s	-	-	-	-	BG-	-	-	CG+			CG+	S.A
	935		A.s	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	BG+	S.A
	941		A.s	+	±	-	-	-	-	-	CG+	BG-	-	-	S.A
Grupo 6 Inoc Intra Epididimal <i>A. seminis</i> en CE I	930	CEI, AD,VS, BU	A.s	+	+	CG+	CG+		NA	NA	NA			A.s	CEI++++ TI+++ TD+
	934		s	+	±				NA	NA	NA			-	CEI++++, CED++ y TI++, TD++
	938	AD	A.s	+	+				NA	NA	NA			-	CEI++++ TI++++ TD+

S.A sin alteraciones
C cola, Ca cabeza, E epidídimo
T testículo, D derecho, I izquierdo
AD- Ampula del Deferente
VS- Vesícula Seminal
BU- Glándula Bulbouretral

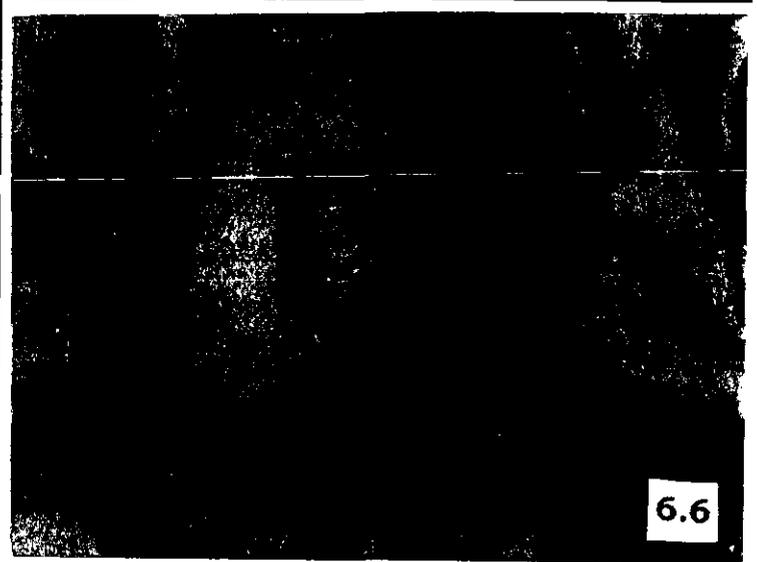
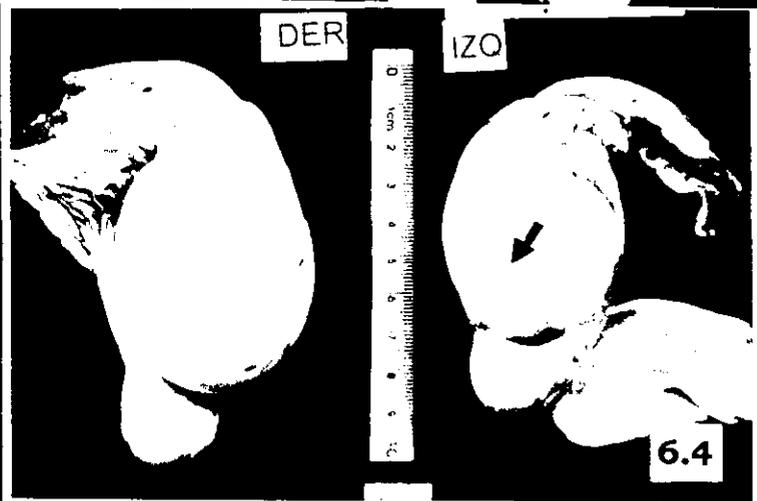
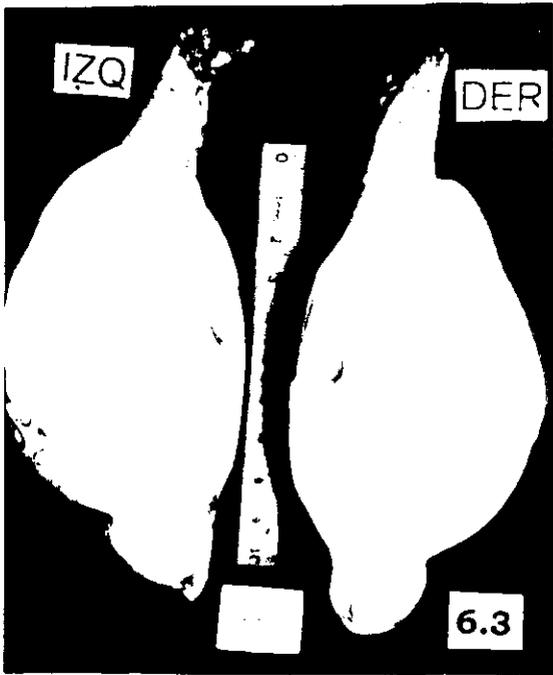
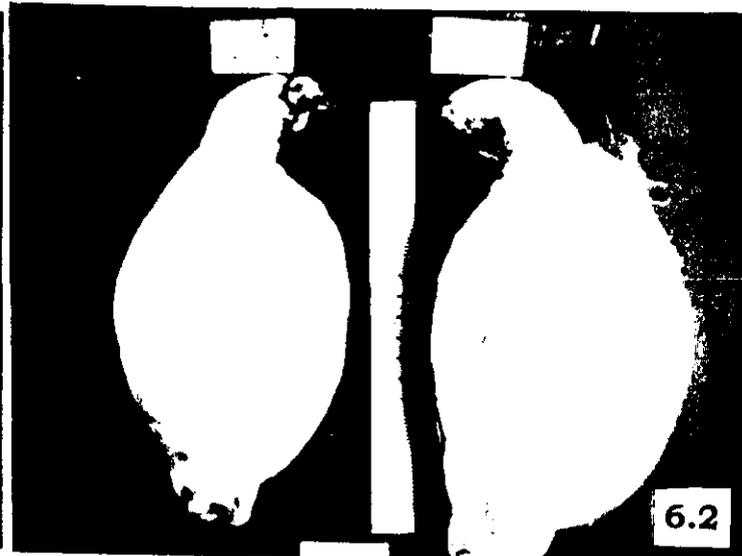
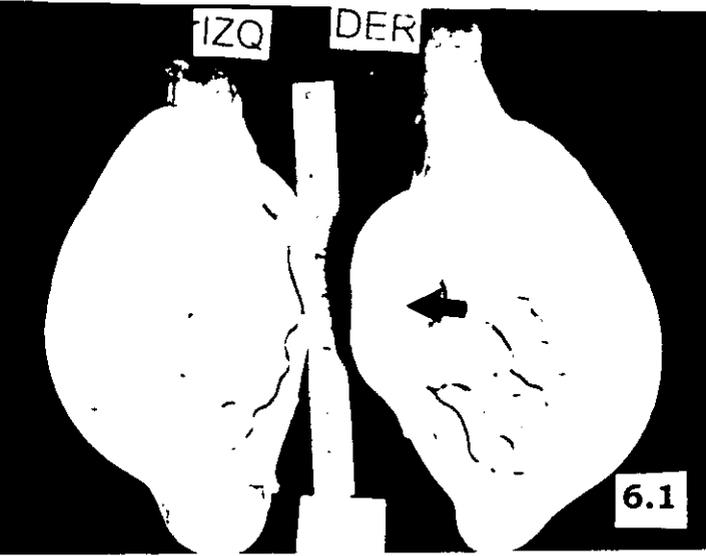
+ positivo a la IDD para *A. seminis*
- negativo a la IDD para *A. seminis*
± dudoso a la IDD para *A. seminis*
Grado de lesión de+ a ++++

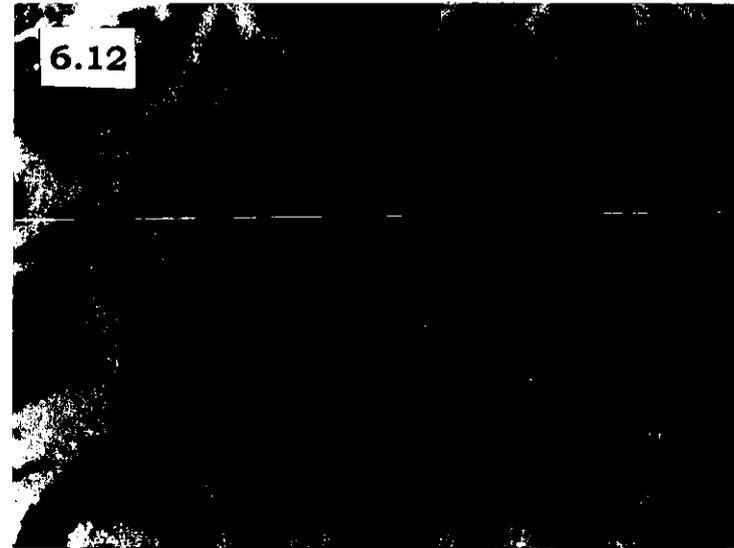
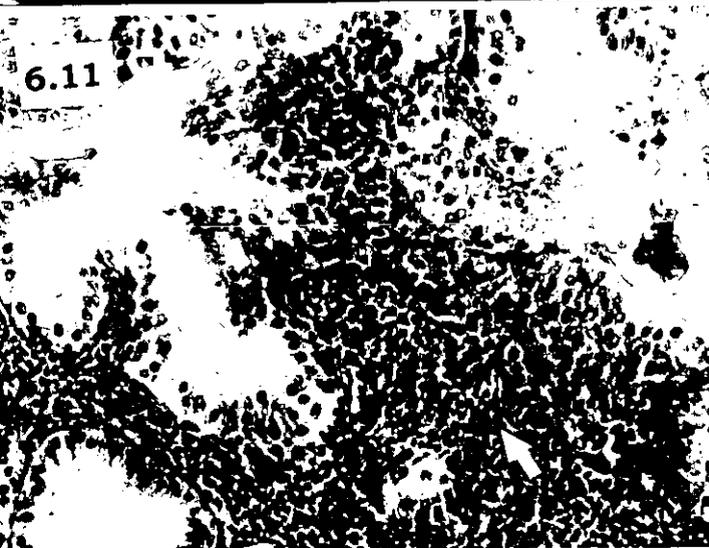
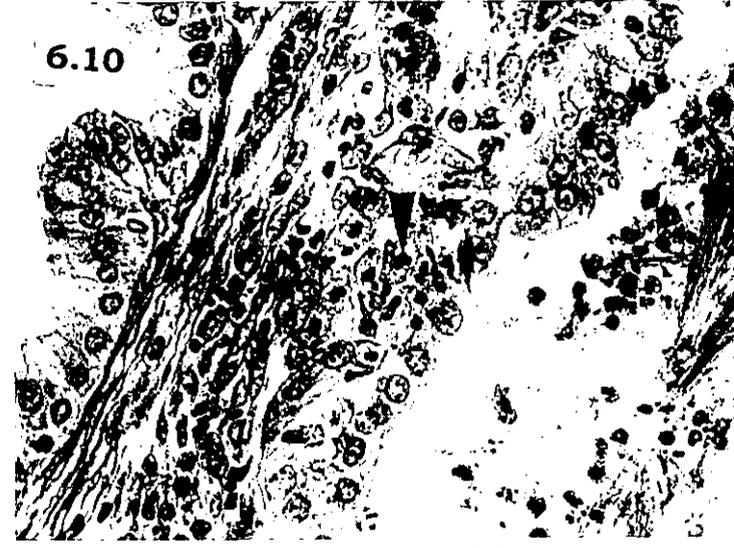
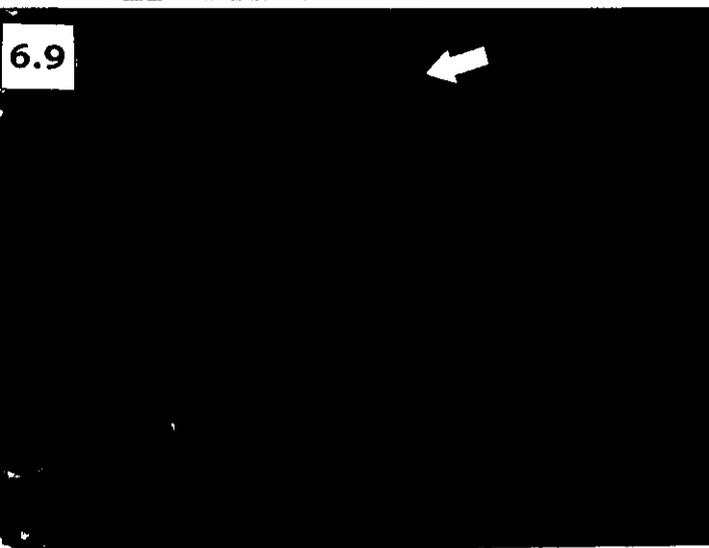
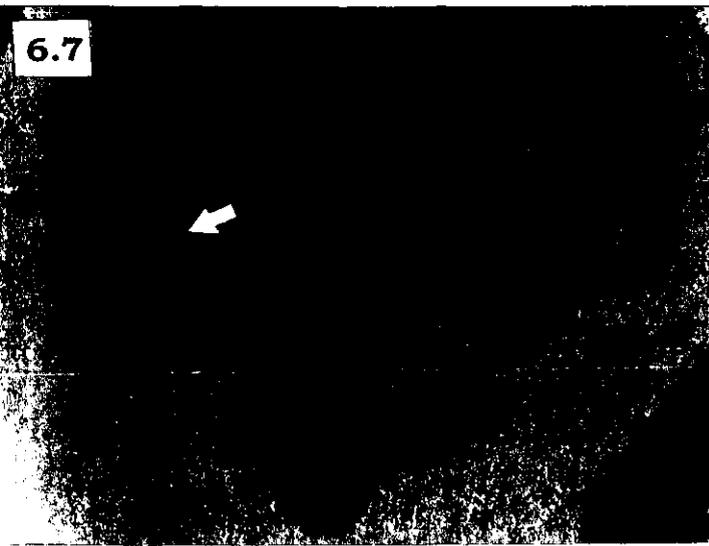
Degeneración testicular
Degeneración testicular e infiltración linfoplasmocitaria
Presencia de infiltrados inflamatorios (PMN, Linfocitos, Macrófagos)
Lesión Granulomatosa de cuerpo extraño
Presencia de alteraciones en epitelio (Hiperplasia, Vesículas intraepiteliales, Metaplasia)
Granuloma espermático
Sin alteraciones patológicas
NA = no analizado

CG+ Cocos Gram +
BG+ Bacilos Gram +
BFG- Bacilos pleomórfico Gram-
- aislamiento negativo
s- sospechosas por ser bacilos pleomórficos descartadas por pruebas bioquímicas o PCR

Fotografías del Experimento I

- 6.1 Animal 877 Nótese el agrandamiento en el cuerpo del epidídimo derecho (➡) y la diferencia en el tamaño de las colas del epidídimo.
- 6.2 Animal 859 Notoria diferencia de tamaño entre ambos testículos y presencia de coloración amarillenta en el testículo izquierdo.
- 6.3 Animal 856 Nótese leve agrandamiento y deformación de la cola del epidídimo izquierdo correspondiente al grado de lesión de una cruz.
- 6.4 Animal 838 Disminución del tamaño del testículo izquierdo, nótese la presencia de adherencias fibrinosas sobre la superficie testicular (➡).
- 6.5 Animal 856 Sección sagital de la vesícula seminal. Nótese puntillado blanquecino en el parénquima (▲).
- 6.6 Animal 856 Testículo izquierdo. Degeneración testicular extrema, pérdida de células de la línea germinal, presencia de célula multinucleada (meiosis aberrante o imperfecta) (➡). Obsérvese el citoplasma espumoso de las células de Sertoli. HE x 400
- 6.7 Animal 833 Ampulla del deferente. Infiltración de células mononucleares subepiteliales rodeando el canal central del deferente (⇔). HE x 100
- 6.8 Animal 833 Vesícula seminal. Presencia de PMN en el interior de los acinos (➡). HE x 400
- 6.9 Animal 884 Cola del epidídimo. Lesión producida por la inoculación de etilenglicol. Presencia de células epitelioides (⇔) y proliferación fibroblástica (➡). HE x 400
- 6.10 Animal 856 Vesícula seminal. Infiltración de PMN en la mucosa acinar (▲). HE x 400
- 6.11 Animal 932 Vesícula seminal. Infiltración linfoide intersticial (⇔). HE x 200
- 6.12 Animal 930 Testículo izquierdo. Degeneración testicular, nótese a los túbulos seminíferos con distinto grado del proceso degenerativo. HE x 100





EXPERIMENTO II

Inoculación intradeferente con *A. seminis*.

7.1. MATERIAL Y METODOS

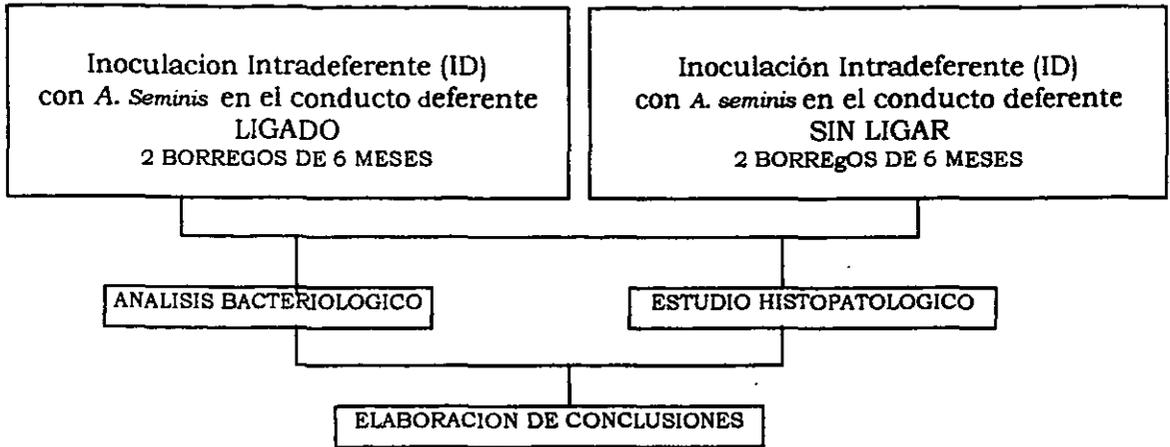
Se realizó la inoculación de una suspensión de *A. seminis* intradeferente (ID), con el conducto deferente ligado (n=2) y sin ligar (n=2).

Se adaptó la técnica descrita por Jansen (1980_c), para la reproducción de la epididimitis por inoculación directa en el conducto deferente. Se aplicaron 0.3 ml de Xilazina (Lab. Cheminova de México) intramuscular, para lograr sedación y analgesia. Luego se sujetó al animal en decúbito dorsal, se rasuró y se realizó antisepsia del escroto. Se anestesió la piel del escroto con Xilocaina al 2% (Lab. Astra, México) en un sector de aproximadamente 4 cm, a la altura de la cabeza del epidídimo derecho. Se incidió el escroto en forma longitudinal, se expuso el cordón espermático derecho, se colocó una sonda acanalada entre la piel y el cordón espermático para mantenerlo exteriorizado. Se incidió la túnica vaginal, se identificó el conducto deferente. En el grupo con el conducto deferente ligado, se ligó el deferente con Dexon a la altura de la cabeza del epidídimo. Luego se les inoculó 0.1 ml de una suspensión de *A. seminis* en SSF, conteniendo 5.8×10^8 UFC/ml, con jeringa de insulina a la altura del cuerpo del epidídimo en dirección a la cola epidídimo, este procedimiento se siguió en los animales con el conducto deferente ligado y no ligado. Luego de la inoculación se realizó la termocauterización en el punto de inoculación para evitar la salida del inóculo. Se realizó sutura de la vaginal con Dexon y de la piel con nylon. En los borregos sin deferente ligado, se procedió de forma similar exceptuando la ligadura del epidídimo.

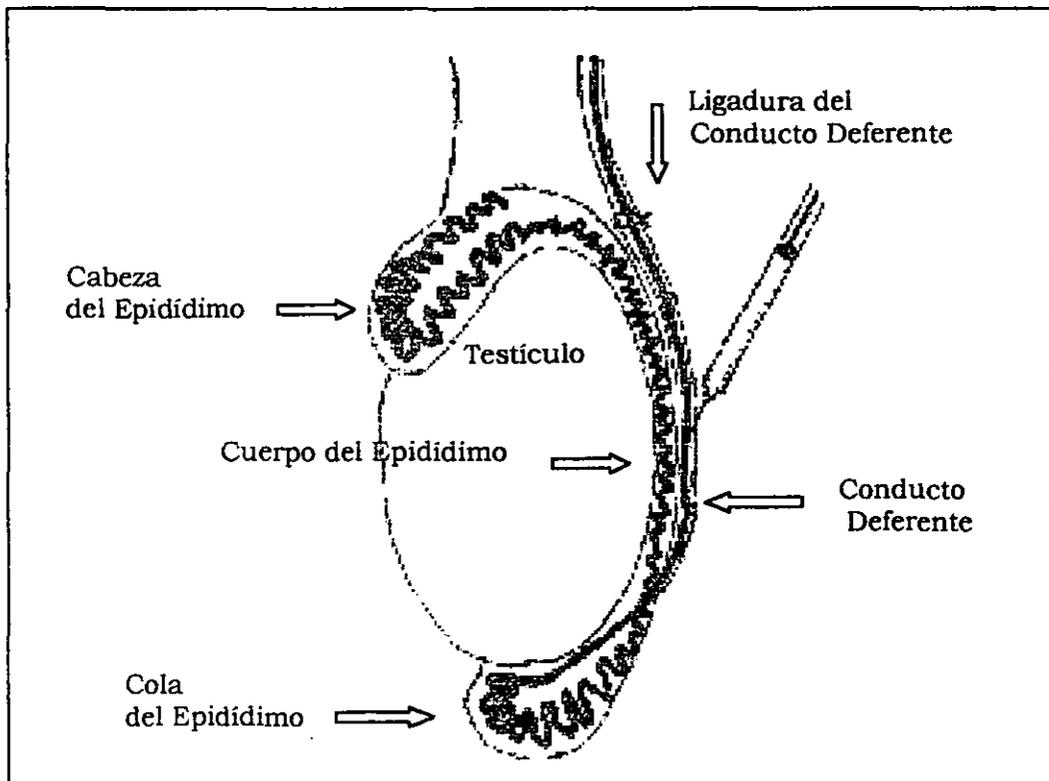
Los animales se sacrificaron a los 20 días de la inoculación, extrayendo las vesículas seminales, ámpulas deferentes, glándulas bulbouretrales, testículos y epidídimos (cola y cabeza) para estudios de bacteriología e histopatología

Experimento II

Diseño Experimental



Esquema del procedimiento de inoculación intradeferente.



7.2. RESULTADOS

Los resultados de este experimento se sintetizan en el Cuadro 7.1. (pag. 66).

7.2.1. Grupo de inoculación intradeferente, sin ligar.

- **Bacteriología**

En los animales inoculados en el conducto deferente sin ligar, se lograron aislamientos de *A. seminis* de los órganos del aparato reproductivo. En uno de los borregos (001), se recuperó *A. seminis* de la lesión producida en el sitio de inoculación en el conducto deferente, también se recuperó de las ámpulas del deferente, glándulas bulbouretrales y vesículas seminales; en el otro (002) se aisló de las ámpulas del deferente. En ninguno de los animales se logró recuperar *A. seminis* de los epidídimos (cabeza y cola) ni de los testículos. Sin embargo, de la cola y de la cabeza del epidídimo del borrego (001) se aislaron cocos Gram (+).

- **Histopatología.**

En la cola del epidídimo derecho del borrego 002, se observó infiltración intersticial e intraluminal de PMN, hiperplasia y descamación de la mucosa epididimal. En el interior de los túbulos epididimales se observaron células multinucleadas de meiosis aberrantes y células de la serie germinal. El borrego 001 presentó leve hiperplasia de la mucosa del epidídimo.

En la cabeza del epidídimo de los borregos 001 y 002, no se observaron alteraciones. Pero en la luz tubular se detectó la presencia de células de la línea germinal, que sugieren la ocurrencia de procesos degenerativos a nivel testicular (Figura 7.1)

En el testículo derecho, de estos animales (001 y 002) se presentó degeneración testicular, con zonas del epitelio germinal adelgazadas y con presencia de células multinucleadas de meiosis aberrantes, mientras que en otros cortes de los túbulos seminíferos se observó epitelio relativamente normal (Figura 7.2).

En el conducto deferente derecho, del borrego 001, en el sitio de inoculación, se observó un ensanchamiento de 0.5 cm de diámetro, con contenido blanco amarillento, del que se aisló *A. seminis*. El examen histopatológico de la lesión demostró infiltración linfoide intersticial, con presencia de manguitos perivasculares. En la mucosa del conducto deferente se observó infiltración de mononucleares e hiperplasia y vesículas intraepiteliales que contenían PMN (Figura 7.3). En el borrego 002 no se observaron lesiones microscópicas.

En la vesícula seminal del 001, se apreció infiltración linfoide de la mucosa con zonas de hiperplasia y áreas de necrosis y se aisló *A. seminis*. En las vesículas del 002 no se observaron cambios patológicos, ni se lograron aislamientos.

El ámpula del deferente del 001, presentó áreas de necrosis de la mucosa e infiltración de PMN, acompañadas de infiltración linfoplasmocitaria intersticial. El ámpula del deferente del borrego 002 presentó áreas de necrosis en la mucosa, con infiltración de macrófagos y PMN en el interior de los acinos y en el área canalicular. De ambos casos se aisló *A. seminis*.

Las glándulas bulbouretrales de los borregos 001 y 002 no presentaron alteraciones patológicas, sin embargo de las del primero se aisló *A. seminis*.

7.2.2. Grupo con inoculación intradeficiente, ligado.

- **Bacteriología**

De los borregos 003 y 004, a los cuales se les ligó el conducto deferente, no se aisló el patógeno de la cola y cabeza del epidídimo, ni en el testículo. De uno de ellos (003), en el cual se estudiaron las glándulas anexas, tampoco se logró aislar el patógeno de las mismas.

En el borrego 004, de la lesión presente en el sitio de inoculación, se aislaron bacilos Gram (+), cocos Gram (+) y bacilos pleomórficos Gram (-). Del testículo y de la cola y cabeza del epidídimo de este animal, se aislaron cocos Gram (+). En el 003, se aislaron cocos Gram (+) de la cabeza del epidídimo.

En el borrego 003, las vesículas seminales y las glándulas bulbouretrales no presentaron alteraciones, las ámpulas del deferente presentaron leve infiltración linfocitaria en la región de la luz canalicular.

Cuadro 7.1

Experimento II Inoculación intradeferente con *A. seminis*

Bacteriología y Patología

Tratamiento	n° del animal	Organos del aparato reproductivo						
		Testiculo Derecho	Cabeza Epididimo Derecho	Cola Epididimo Derecho	Conducto Deferente Derecho	Ampula Deferente	Vesicula Seminal	Glándula Bulbouretral
Intra-deferente, con el conducto deferente sin ligar	001	-	CG+	CG+	<i>A. sem</i>	<i>A. sem</i>	<i>A. sem</i>	<i>A. sem</i>
	002	-	-		NA	<i>A. sem</i>	-	-
Intra-deferente, con el conducto deferente ligado	003	-	CG+		NA	CG+	-	-
	004	CG+	CG-	CG+	CG+/BG+ BPG	NA	NA	NA

CG+ Cocos Gram +

BG+ Bacilos Gram +

BPG- Bacilos pleomórfico Gram-

- aislamiento negativo

	Degeneración testicular
	Presencia de infiltrados inflamatorios (PMN, Linfocitos, Macrófagos)
	Presencia de alteraciones en epitelio (Hiperplasia, Vesículas intracitoplásmicas, Metaplasia)
	Granulomas espermático-abscedativos
	Sin alteraciones patológicas
NA	No Analizado

7.3. DISCUSION

Resulta de interés el hecho que en los animales en los que el conducto deferente no se ligó (001, 002), las bacterias inoculadas se movieron aparentemente siguiendo el flujo seminal encontrándose en las glándulas anexas, sin alcanzar las colas de los epidídimos del lado inoculado. En el mismo sentido apunta el hecho de que, en el animal en que se ligó el deferente y se estudiaron las glándulas anexas (003), no se lograron aislamientos en ningún sector del aparato reproductor. A pesar de que se encontraron infiltrados inflamatorios y lesiones características en las colas de los epidídimos de los borregos ligados y no ligados, no se aisló *A. seminis* del epidídimo ni del testículo. Es posible que la respuesta inflamatoria local, desarrollada durante esos 20 días, resultara suficiente para eliminar la bacteria del epidídimo.

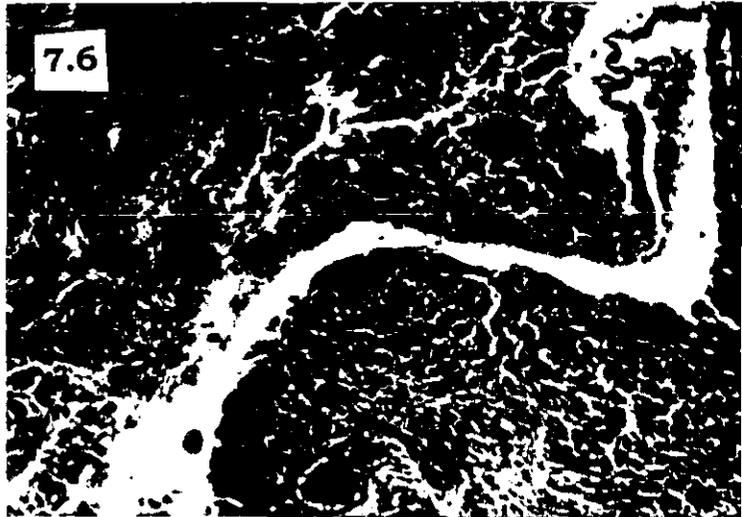
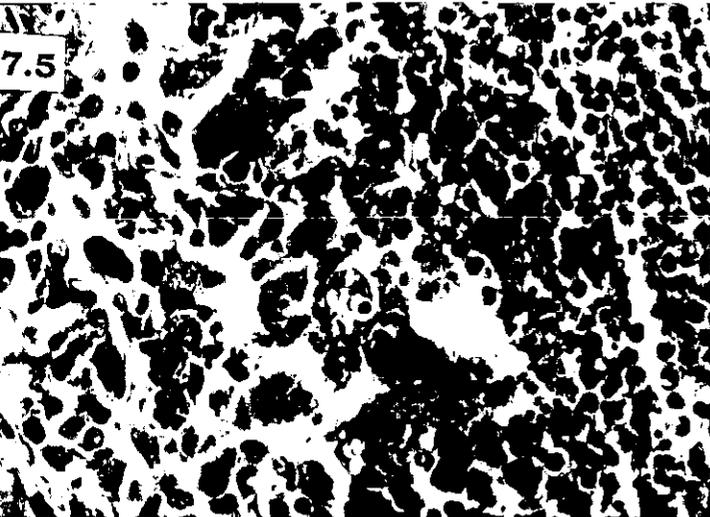
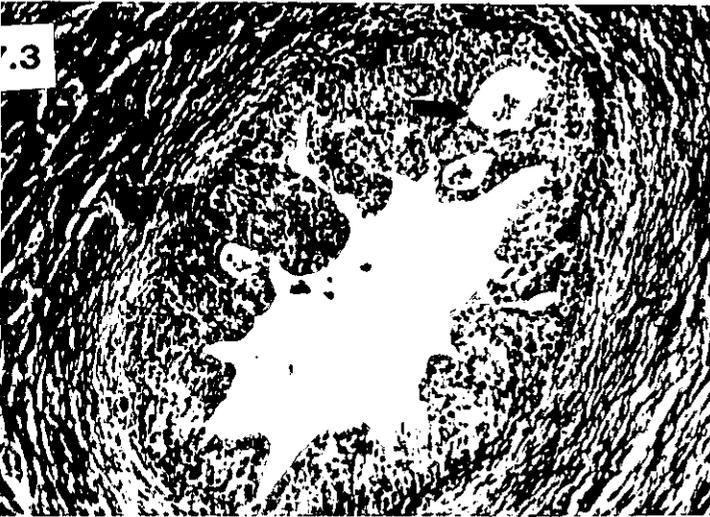
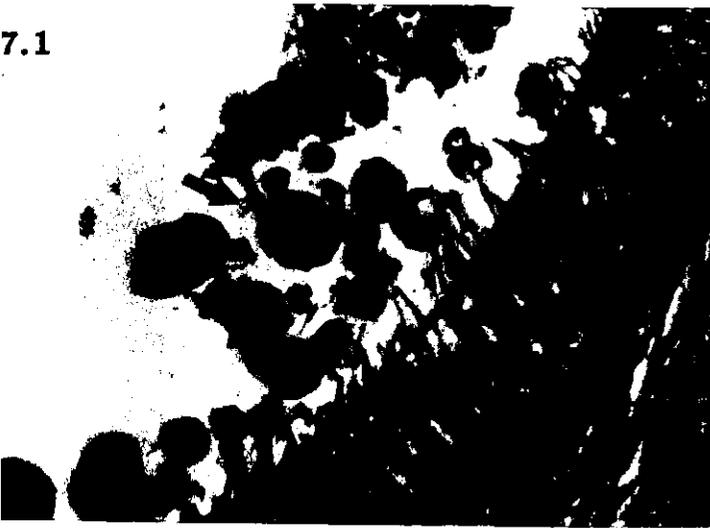
En experimentos similares, con la inoculación de conteos muy bajos de *H. ovis* o de *C. pseudotuberculosis* se encontró patología epididimal y se lograron aislar las bacterias a los 10 días (Jansen, 1983). Por otro lado, cuando se inocularon cantidades mayores de *C. paurometabolium*, bacteria no patógena, pero que se ha encontrado en el epidídimo de animales sanos, se obtienen cultivos negativos a los 10 días, sin presencia de lesión en la cola del epidídimo (Jansen, 1983). Al-Katib y Ogunjumo citados por Alsemosy y Dennis (1985) constataron la rápida desaparición de *A. seminis* del lugar de inoculación en la cola del epidídimo, así como de la articulación carpal y de los pulmones.

Por otro lado, en casos de campo, es frecuente la existencia de alteraciones epididimales, sin la presencia del patógeno en el órgano, en cambio este se encontró presente en las glándulas anexas (Baynes y Simmons 1960; Simmons *et al.* 1966; Ekdahl 1968). Esta condición puede explicar lo observado en el borrego 003, en el cual la cola del epidídimo resultó bacteriológicamente estéril y con una fuerte respuesta inflamatoria, con PMN, macrófagos, proliferación fibroblástica presencia de células epitelioides, algo similar ocurrió en el conducto deferente del 004 con una respuesta similar, sin presencia de *A. seminis* pero si de otras bacterias que pudieron ingresar en la intervención quirúrgica. El aspecto de ambas lesiones recuerda la estructura de un granuloma espermático, células epitelioides que rodean la masa central de espermatozoides, presencia de macrófagos fagocitando espermatozoides, pero con la presencia de PMN y escasa proliferación fibroblástica, estructuras similares son definidas por Saravanamuthu *et al.*, (1991) como granulomas espermáticos tempranos, la severidad de estas lesiones granulomatosas pudo

generar condiciones que resultaron en un ambiente de inviabilidad para *A. seminis*. En estos animales la espermioestasis provocada por la obstrucción de la ligadura del conducto deferente, junto con la destrucción de la mucosa y el edema provocados por las bacterias, pudo contribuir a la salida de espermatozoides del túbulo epididimal, con el establecimiento de procesos autoinmunes (Mc Donald y Pineda 1989; Sargison *et al.* 1995)

Fotografías del Experimento II

- 7.1 Animal 001 Cabeza del epidídimo. Presencia de células multinucleadas () y de línea germinal en el interior del túbulo, que indican degeneración testicular. HE x 400
- 7.2 Animal 001 Testículo. Degeneración testicular. Nótese en uno de los túbulos la ausencia total de células germinales, persistiendo únicamente las células de Sertoli. HE x 400
- 7.3 Animal 001 Conducto deferente. Nótese la hiperplasia de la mucosa con la presencia de vesículas intraepiteliales e infiltración de células mononucleares (). HE x 100
- 7.4 Animal 003 Cola del epidídimo. Evaginación de la mucosa epididimal () y presencia de PMN en el interior del túbulo. HE x 200
- 7.5 Animal 004 Cola del epidídimo. Granuloma espermático temprano, nótese la presencia de PMN, células epitelioides y macrófagos fagocitando espermatozoides. HE x 400
- 7.6 Animal 004 Conducto deferente. Espermatozoides compactados pérdida del epitelio del deferente, infiltración mononuclear y presencia de células epitelioides. HE x 100



8. EXPERIMENTO III

Inoculación intraepididimal con *A. seminis* y *B. ovis*

8.1. MATERIAL Y METODOS

Se realizó el estudio serológico comparativo, bacteriológico en semen y en órganos e histopatológico de las colas del epidídimo y testículos, en borregos inoculados por vía intraepididimal (IE) con *B. ovis* y *A. seminis*.

Se empleó un total de 13 borregos de 6 meses, los cuales recibieron los siguientes tratamientos:

- Grupo de inoculación intraepididimal con *A. seminis*, estos 3 animales corresponden al grupo 6 del experimento I, los cuales recibieron en la cola del epidídimo izquierdo 1 ml de *A. seminis* con 1.6×10^8 UFC/ml.
- Grupo de inoculación intraepididimal conjunta con *A. seminis* y *B. ovis*, 5 borregos recibieron en la cola del epidídimo izquierdo, en forma conjunta, 0.5 ml de una suspensión de *A. seminis* en SSF con 1.6×10^8 UFC/ml y 0.5 ml de una suspensión de *B. ovis* con 4.9×10^8 UFC/ml.
- Grupo con inoculación intraepididimal con *B. ovis*, 5 borregos recibieron en la cola del epidídimo izquierdo 1ml de una suspensión de *B. ovis* en SSF estéril con 4.9×10^8 UFC/ml.

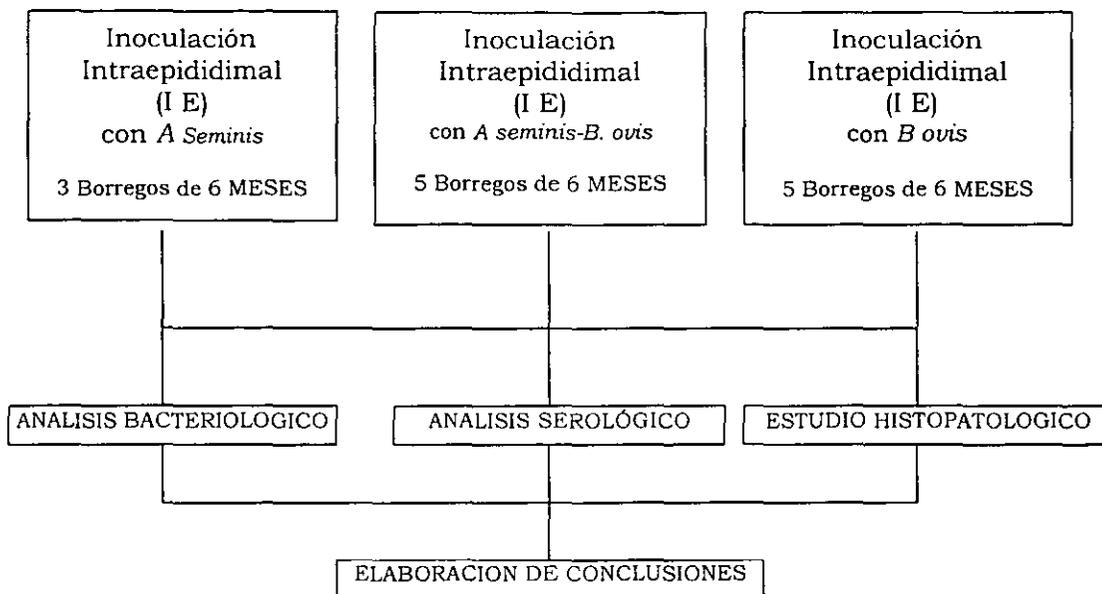
La inoculación se realizó con jeringas de insulina luego de realizar una cuidadosa higiene del escroto.

Cada 7 días se tomaron muestras de sangre para IDD y de semen. Se realizó el frotis y el examen bacteriológico del semen.

Se castraron los animales a los 35 días posinoculación extrayendo fragmentos de testículos y epidídimo (cabeza y cola) para patología y bacteriología.

Experimento III

Diseño Experimental



8.2. RESULTADOS

8.2.1 Grupo de inoculación con *B. ovis* intraepididimal.

- Examen clínico. (Cuadro 8.1., pag. 78)

En el grupo de inoculación intraepididimal con *B. ovis* se registró en todos los animales aumento de tamaño en la cola del epidídimo inoculado. En dos de ellos se presentaron lesiones de tres cruces (839, 857), en uno de dos cruces (841) (Figura 8.1) y en otros dos, lesiones leves de una cruz (866, 880). Se observó además aumento de tamaño en ambos cuerpos del epidídimo en un animal 866 (Figura 8.2.) y en la cabeza del epidídimo de otros dos (839, 866).

- Serología y bacteriología de órganos y semen. (Cuadro 8.2., pag. 79)

En este grupo se recuperó *B. ovis* del lugar de inoculación en 4/5 borregos (839, 841, 857, 866), en dos de estos (841 y 857) se lograron aislamientos del testículo izquierdo, y de la cabeza del epidídimo izquierdo en el 857. Es de hacer notar que en los animales 857 y 866 se estudiaron las cabezas del epidídimo porque presentaban alteraciones evidentes a la necropsia, caracterizadas por el aumento de tamaño y pérdida de la simetría. Del borrego 866 se aislaron bacilos filamentosos Gram (-) que no se caracterizaron, de la cabeza del epidídimo izquierdo, de la cola del epidídimo derecho y del testículo derecho. El borrego 880 resultó negativo a los intentos de aislamiento en los órganos.

Se identificó *B. ovis* en las muestras de semen en 2/5 (839, 841).

En lo que respecta a la respuesta serológica, en el animal 839 se detectaron reacciones positivas a la 2ª y 3ª semana, negativa a la 4ª y nuevamente resultó positiva en la 5ª semana. Los animales 841 y 857 presentaron reacción positiva durante la 4ª y la 5ª semana. Los otros dos animales (866,880) no mostraron reacciones positivas durante las 5 semanas que duró la evaluación.

- **Hallazgos histopatológicos.** (Cuadro 8.3., pag. 80)

Los hallazgos histopatológicos en este experimento se describirán animal por animal.

En el animal 839 se apreció en la cola izquierda del epidídimo, lugar de inoculación, la formación de un granuloma espermático caracterizado por una masa central de espermatozoides rodeada por macrófagos, células epitelioides y multinucleadas de cuerpo extraño (Figuras 8.3 y 8.4), se aisló *B. ovis*. El testículo izquierdo mostró un cuadro degenerativo con presencia de células multinucleadas de meiosis aberrantes y adelgazamiento del epitelio germinal. En el testículo y epidídimo derecho no se observaron cambios patológicos.

Las lesiones encontradas en la cola izquierda del epidídimo del borrego 841, se caracterizaron por hiperplasia de la mucosa, vesículas intraepiteliales e infiltración de PMN. Se observó infiltración intersticial de macrófagos y linfocitos acompañada de PMN en el interior del túbulo epididimal (Figura 8.5). El testículo izquierdo presentó infiltración linfocitaria intersticial con pérdida casi total del epitelio germinal, con una gran cantidad de túbulos seminíferos con solo células de Sertoli en su interior. De la cola y cabeza del epidídimo y del testículo se aisló *B. ovis*. En el testículo derecho no se observaron alteraciones patológicas, la cola derecha presentó zonas de hiperplasia.

Las lesiones en la cola izquierda del epidídimo del animal 857 se caracterizaron por hiperplasia, vesículas intraepiteliales e infiltración linfoide de la mucosa epididimal, con escasos espermatozoides en el interior del epidídimo. En este animal se observó un granuloma espermático en la cabeza del epidídimo izquierdo (Figuras 8.6 y 8.7), con características similares al descrito en el animal 839, en concordancia con la aparición de cortes del túbulo con espermatozoides compactados y otros vacíos. El testículo izquierdo mostró cambios degenerativos caracterizados por la pérdida de células germinales, fibrosis e infiltración linfoide intersticial. De las tres estructuras anteriormente mencionadas se aisló *B. ovis*. En el testículo y epidídimo derecho no se apreciaron cambios patológicos.

En la cola izquierda del epidídimo del borrego 866, se observó hiperplasia del epitelio con la formación de vesículas intraepiteliales, infiltración linfoide intersticial, PMN y macrófagos en el epitelio epididimal y en el interior del túbulo. Estos hallazgos histopatológicos coincidieron con la recuperación de *B. ovis*. En el testículo izquierdo se encontró degeneración testicular con disminución del espesor del epitelio germinal y presencia de células multinucleadas de meiosis aberrantes, no se aisló *B. ovis*. En la cola derecha, se presentó un granuloma espermático con abundante infiltración linfoide en todo el intersticio y la presencia de manguitos perivasculares de células mononucleares. En el epitelio epididimal de los cortes del túbulo vecinos al granuloma se apreciaron áreas de necrosis e hiperplasia. En la cabeza del epidídimo derecho se apreció un granuloma espermático, con las mismas alteraciones mencionadas en la cola. El testículo derecho presentó degeneración con adelgazamiento del epitelio germinal. Estos hallazgos histopatológicos coincidieron con el aislamiento de un bacilo Gram (-) de aspecto filamentoso.

En la cola izquierda del epidídimo del animal 880, a pesar de no aislarse bacterias, se observó hiperplasia de mucosa e infiltración de macrófagos y linfocitos. En el testículo izquierdo se encontró degeneración leve caracterizada por la presencia de túbulos seminíferos con epitelio adelgazado y escasas espermátidas.

De los resultados surge que en los 5 borregos inoculados con *B. ovis* se encontraron alteraciones histopatológicas en el lugar de la inoculación. En 4/5 se presentaron alteraciones en la mucosa: hiperplasia, vesículas intraepiteliales y metaplasia con pérdida de las vellosidades, acompañadas en la mayoría de los casos por infiltrados celulares intersticiales, intraepiteliales e intraluminales de PMN, linfocitos y macrófagos. En 1/5 en el punto de inoculación se presentó un granuloma espermático. En los 5 testículos correspondientes al epidídimo inoculado se observaron cambios degenerativos con disminución del espesor del epitelio germinal, presencia de células multinucleadas y pocos túbulos con espermátidas alargadas.

8.2.2. Grupo de inoculación intraepididimal con *A. seminis*

Los hallazgos clínicos, bacteriológicos, serológicos y patológicos de los animales con inoculación intraepididimal de *A. seminis* se describieron en el experimento I (grupo 6, animales 930, 934 y 938, pag 41) y se muestran en los Cuadros 8.1, 2,3. (pag 79-81)

8.2.3. Grupo de inoculación conjunta con *A. seminis* / *B. ovis*.

- **Examen clínico.** (Cuadro 8.1., pag. 79).

En el grupo de inoculación intraepididimal conjunta con *A. seminis* y *B. ovis*, en todos los animales se presentó aumento de tamaño en las colas del epidídimo. En el borrego 889 se registró la lesión de mayor grado en la cola del epidídimo inoculada, que se acompañó de disminución del tamaño testicular y leve agrandamiento e induración de la cabeza del epidídimo derecho (889) (Figura 8.8). En otros dos, se presentaron lesiones de tres cruces en la cola del epidídimo, acompañadas de disminución de tamaño y tono testicular (852, 910) (Figura 8.9), por último se presentó induración y aumento de tamaño leve en la cola del epidídimo inoculada en dos animales (886, 898).

- **Serología y bacteriología de órganos y semen.** (Cuadro 8.2., pag. 80)

En el grupo de inoculación *A. seminis* / *B. ovis*, de los animales 852, 910 y 889 se recuperó *B. ovis* de la cola izquierda, en el 910 y 889 se aisló además del testículo del mismo lado. En dos borregos (886, 889) se aisló *A. seminis* de la cola izquierda, en el 889 se aisló además del testículo izquierdo.

En 3/5 (852, 889, 910) se logró aislar de semen *B. ovis* y en 2/5 (886, 889) se logró aislar *A. seminis*.

En lo que respecta a la respuesta serológica 4/5 (852, 886, 889, 910) borregos resultaron positivos a la serología para *B. ovis*. La serología positiva para *B. ovis* se presentó a partir de la 1ª semana para el animal 910, en otros dos (852 y 889) la 2ª semana y en el 866 a la 3ª. En dos casos se revirtió la positividad en el período de estudio (852, 886). En la serología para *A. seminis* 1/5 resultó positivo en la 5ª semana teniendo reacciones dudosas en la 3ª y 4ª (898) y 1/5 mostró reacciones dudosas en la 3ª y 4ª semanas. No se produjo cruce antigénico cuando se corrieron pruebas control, utilizando antígeno HS de *B. ovis* y el suero hiperinmune contra *A. seminis* de conejo, lo mismo ocurrió con el suero control positivo de *B. ovis* y el antígeno soluble de *A. seminis*.

- **Hallazgos histopatológicos.** (Cuadro 8.3., pag. 81)

Las lesiones encontradas en la cola izquierda del 852, del que se aisló *B. ovis*, se caracterizaron por la presencia de hiperplasia de la mucosa con infiltración de PMN y la presencia de abundantes PMN en la luz tubular. El epitelio germinal del testículo izquierdo se presentó adelgazado con la presencia de células multinucleadas en algunos túbulos. El testículo y la cola del epidídimo derecho no presentaron lesiones.

En la cola del epidídimo izquierdo del borrego 886 se observaron zonas del epitelio con hiperplasia, vesículas intraepiteliales e infiltración de PMN. Se encontró gran cantidad de PMN en el interior del túbulo, acompañados por aumento de tejido fibroso intersticial. De este segmento se recuperó *A. seminis*. El testículo izquierdo mostró degeneración focal del epitelio germinal. En el testículo y la cola del epidídimo derecho no se apreciaron lesiones.

En la cola del epidídimo izquierdo del borrego 889 se observó hiperplasia del epitelio, infiltración de PMN y presencia de los mismos en el interior del túbulo, junto con células de la línea germinal. En el intersticio se encontró aumento del tejido fibroso intersticial. Se aisló *A. seminis* y *B. ovis*. El testículo izquierdo presentó degeneración con ausencia de espermátidas. Se realizó la histopatología y bacteriología de la cabeza del epidídimo derecho, porque presentó lesiones macroscópicas a la necropsia, esta lesión resultó ser un granuloma espermático que se asoció con zonas hiperplásicas en la mucosa de la cola del epidídimo derecho y cambios degenerativos en el testículo derecho, de estas lesiones no se aislaron bacterias.

En la mucosa del epidídimo izquierdo del borrego 898 se observaron vesículas intraepiteliales, infiltración de PMN, zonas de metaplasia y necrosis (Figura 8.10). Los cortes del túbulo contuvieron escasos espermatozoides o ausencia de los mismos. Se observó un granuloma abscedativo en un segmento del túbulo, el cual había perdido la mucosa, se saturó de PMN y se rodeó de tejido fibroso; de la lesión se aisló *A. seminis*. El testículo izquierdo presentó degeneración. El testículo y la cola del epidídimo derecho no mostraron lesiones.

En la cola del epidídimo izquierdo del animal 910 se observaron vesículas intraepiteliales, cortes del túbulo con metaplasia y pérdida del epitelio, asociados con abundante infiltración linfocitaria intersticial y con PMN y macrófagos en el interior del túbulo. Se observó además un granuloma abscedativo, con las mismas características del de la cola del epidídimo izquierdo del 889, del que se aisló *B. ovis* (Figura 8.11). El testículo izquierdo, del que se aisló *B. ovis*, mostró infiltración linfoide intersticial focal (Figura 8.12), con pérdida del epitelio germinal asociado con células multinucleadas de meiosis aberrantes. En el testículo y la cola del epidídimo derecho no se observaron lesiones.

Cuadro 8.1

Experimento III

Inoculación intraepididimal con *A. seminis* y *B. ovis*

Alteraciones al Examen Clínico

Inóculo	n°	Localización de las alteraciones en el examen clínico
<i>B. ovis</i> Intraepididimal en la Cola del epidídimo izquierdo	839	CEI+++ y CaED+
	841	CEI++
	857	CaEI+++
	866	CaED e I++++, CuED e I++ ,CEI+
	880	CEI+
<i>A.sem/B.ovis</i> de forma conjunta Intraepididimal Cola del epidídimo izquierdo	852	CEI+++y TI++
	886	CEI+
	889	CEI++++ ,TI++ y CaED+
	898	CEI+
	910	CEI+++ y TI++
<i>A. seminis</i> -Intraepididimal Cola del epidídimo izquierdo	930	CEI++++ y TI++
	934	CEI+++ y TI++
	938	CEI++++y TI+++

CEI - Cola Epidídimo Izquierdo

CaEI- Cabeza Epidídimo Izquierdo

CaED- Cabeza Epidídimo Derecho

CuED- Cuerpo Epidídimo Derecho

TI- Testículo izquierdo

Grado de lesión de + a ++++

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Cuadro:8.2

Experimento III
Inoculación intraepididimal con *A. seminis* y *B. ovis*

Serología y aislamientos de semen y órganos

Inóculo	n°	Aislamientos de los órganos						Aislamiento de semen de <i>A. seminis</i> / <i>B. ovis</i> Semanas					Serología Semanas					
		Test. Izq	Cola Izq	Test. Der	Cola Der	Cab. Izq	Cab Der	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	
<i>B. ovis</i>	Cola Epid Izq	839	-	<i>B. ovis</i>	-	-	*	*			s	<i>B.o</i>	<i>B.o</i>	n	p	p	n	p
		841	<i>B. ovis</i>	<i>B. ovis</i>	-	-	*	*	s	<i>B.o</i>				n	n	n	p	p
		857	<i>B. ovis</i>	<i>B. ovis</i>	-	-	<i>B. ovis</i>	*	s					n	n	n	p	p
		866	-	<i>B. ovis</i>	BFG-	BFG-	BFG-	*					s	n	n	n	n	n
		880	-	-	-	-	*	*	s		s		s	n	n	n	n	n
<i>A. sem</i> / <i>B. ovis</i>	Cola Epid. Izq.	852	-	<i>B. ovis</i>	-	-	*	*	s		<i>B.o</i>	s		-/n	-/p	±/n	±/n	-/p
		886	-	<i>A. sem</i>	-	-	*	*	s	s	s	s	<i>A.s</i>	-/n	-/n	-/p	-/n	-/n
		889	<i>B. ovis</i>	<i>A.s/B.o</i>	-	-	*	-			<i>A.s/B.o</i>			-/n	-/p	-/p	-/p	-/p
		898	-	<i>A. sem</i>	-	-	*	*						-/n	-/n	±/n	±/n	+/n
		910	<i>B. ovis</i>	<i>B. ovis</i>	-	-	*	*	<i>B.o</i>	<i>B.o</i>	<i>B.o</i>				-/p	-/p	-/p	-/p
<i>A. seminis</i>	Cola Epid. Izq.	930	CG+	<i>A. sem</i>	*	*	*	*	s	<i>A.s</i>		<i>A.s</i>	<i>A.s</i>	±	±	+	±	±
		934	-	CG+	*	*	*	*		s				-	-	-	±	±
		938	-	-	*	*	*	*	<i>A.s</i>	s	s		s	+	+	+	+	+

CG+ Cocos Gram positivos

BG+ Bacilos Gram positivos

BFG- Bacilos Filamentos Gram negativos

s- sospechosas por ser bacilos pleomórficos descartadas por bioquímicas o PCR

* No se estudiaron salvo algunas con lesiones evidentes

p- positivo a la IDD para *B. ovis*

n- negativo a la IDD para *B. ovis*

+ positivo a la IDD para *A. seminis*

- negativo a la IDD para *A. seminis*

± dudoso a la IDD para *A. seminis*

Cuadro:8.3

Experimento III

Inoculación intraepididimal con *A. seminis* y *B. ovis*

Bacteriología, Patología y Hallazgos clínicos

Inóculo	n°	Organos del aparato reproductivo						Localización de alteraciones al examen clínico
		Test. Izq	Cola Izq	Test.Der	Cola Der	Cab. Izq	Cab Der	
<i>B. ovis</i> Cola Epid Izq	839	-	<i>B. ovis</i>	-	-	*	*	CEI+++ y CaED+
	841	<i>B. ovis</i>	<i>B. ovis</i>	-	-	*	*	CEI++
	857	<i>B. ovis</i>	<i>B. ovis</i>	-	-	<i>B. ovis</i>	*	CaEI+++
	866	-	<i>B. ovis</i>	BFG-	BFG-	BFG-	*	CaED e I++++, CuED e I++ ,CEI+
	880	-	<i>B. ovis</i>	-	-	*	*	CEI+
<i>A. sem/B. ovis</i> Cola Epid. Izq.	852	-	<i>B. ovis</i>	-	-	*	*	CEI+++y TI++
	886	-	<i>A. sem</i>	-	-	*	*	CEI+
	889	<i>B. ovis</i>	<i>A. sem</i>	-	-	*	-	CEI++++ ,TI++ y CaED+
	898	-	<i>A. sem</i>	-	-	*	*	CEI+
	910	<i>B. ovis</i>	<i>B. ovis</i>	-	-	*	*	CEI+++ y TI++
<i>A. seminis</i> Cola Epid. Izq.	930	CG+	<i>A. sem</i>	*	*	*	*	CEI++++y TI++
	934	-	CG+	*	*	*	*	CEI++++y TI++
	938	X	<i>A. sem</i>	*	*	*	*	CEI++++y TI+++

X	Degeneración testicular	C cola, Ca cabeza, Cu cuerpo, E epididimo
X	Degeneración testicular e infiltración linfoplasmocitaria	T testículo, D derecho, I izquierdo
	Granuloma espermático	Grado de lesión de+ a ++++
	Presencia de infiltrados inflamatorios (PMN, Linfocitos, Macrófagos)	CG+ Cocos Gram positivos
	Presencia de alteraciones en epitelio (Hiperplasia, Vesículas intraepididimales)	BG+ Bacilos Gram positivos
	Sin alteraciones patológicas	BFG- Bacilos Filamentosos Gram negativos
*	No determinado: se estudiaron algunas con alteraciones evidente - aislamiento negativo	

8.2.4. **Estudio de semen.** (Cuadro 8.4., pag. 83)

En el grupo infectado con *B. ovis* se observaron PMN en los muestreos de semen de los 5 animales del grupo.

En el grupo *A. seminis/ B. ovis* se encontraron PMN en el semen en 2/5 animales.

En los tres animales inoculados con *A. seminis* se encontraron PMN en semen.

Los hallazgos de células de descamación y bacterias se presentan en el Cuadro 8.4. Es de resaltar que en los animales de los tres grupos se demostraron bacterias y restos celulares en los extendidos.

Cuadro 8.4

Experimento III

Inoculación intraepididimal con *A. seminis* y *B. ovis*

Estudio seminal

Tratamiento	n°	Estudio de frotis de semen					Aislamientos en semen de <i>A.semi/B.ovis</i>
		PMN	Macrófagos.	Esperma	Restos celulares	Bacterias	
<i>B. ovis</i> en la Cola del Epididimo Izquierdo	839	1/3	-	-	1/3	1/3	B.o
	841	1/4	-	-	1/4	-	B.o
	857	1/4	2/4	1/4	2/4	1/4	s
	866	1/5	-	-	3/5	1/5	s
	880	2/5	-	-	5/5	4/5	s
<i>A.sem/B.ovis</i> en la Cola Epididimo Izquierdo.	852	3/5	3/5	2/5	3/5	2/5	B.o
	886	-	1/5	-	3/5	1/5	A.s
	889	-	-	1/5	3/5	1/5	A.s/B.o
	898	-	-	-	3/5	2/5	A.s
	910	1/4	-	-	3/4	2/4	B.o
<i>A. seminis</i> en la Cola del Epididimo Izquierdo.	930	2/4	1/4	2/4	-	2/4	A.s
	934	1/4	1/4	-	4/4	4/4	s
	938	2/4	2/4	-	1/4	4/4	A.s

positivos/n° de frotis realizados

s- sospechosas por ser bacilos pleomórficos descartadas por pruebas bioquímicas o por PCR

8.3. DISCUSION

La discusión de este experimento puede ser seguida con la observación del Cuadro Resumen 8.5., (pag. 88).

En los 5 borregos inoculados en la cola del epidídimo con *B. ovis* se encontraron alteraciones histopatológicas en el lugar de la inoculación que se asociaron con degeneración testicular. Las lesiones observadas en las colas del epidídimo son coincidentes con las encontradas en casos de campo e inoculaciones experimentales con *B. ovis* (Biberstein 1963; Pérez *et al.* 1979; Rahaley y Dennis 1984; Plant *et al.* 1986). Los cambios degenerativos en los testículos se atribuyen a las alteraciones que se presentan en la cola del epidídimo (Biberstein 1964; Jubbe *et al.* 1985; Searson 1987). En dos de estos testículos además de los procesos degenerativos se apreciaron infiltrados inflamatorios de mononucleares coincidentes con la presencia de *B. ovis* y que pueden asociarse a la bacteria y/o atribuirse al desarrollo de fenómenos autoinmunes.

No siempre se recuperó *B. ovis* del lugar de inoculación (880) pese a que se encontró leve agrandamiento de la cola del epidídimo al examen clínico y a la histopatología infiltración linfocitaria intersticial moderada con alteración hiperplásica de la mucosa. Este caso pudo tratarse de una infección abortiva, dada la escasa presencia de células inflamatorias mononucleares y la ausencia de PMN y bacterias, este tipo de infección fue descrita en borregos infectados experimentalmente, en los que además, como en este caso, no se desarrollaron títulos de anticuerpos (Biberstein *et al.* 1962; Laws 1972).

B. ovis no fue aislada en todas las ocasiones de los testículos correspondientes a los epidídimos inoculados, resultados similares obtienen Rahaley y Dennis (1984). Estos autores tampoco logran aislar la bacteria del testículo y epidídimo contralateral, coincidiendo con los hallazgos de este experimento.

Es de destacar el hallazgo de granulomas espermáticos en las cabezas del epidídimo izquierdo los animales 857 y 866, de los que se aisló *B. ovis* en el primero y un bacilo filamentosos Gram (-) en el segundo. El granuloma espermático de la cabeza del epidídimo izquierdo del borrego 866 se asoció con otro presente en la cola del epidídimo derecho del cual se aisló también un bacilo filamentosos Gram (-) y con lesiones degenerativas en ambos testículos. Estas lesiones presentaron un aspecto similar a las descritas por de la Puente Redondo (2000) y podrían depender del desarrollo de procesos autoinmunes a partir del daño provocado por la inoculación en la cola del epidídimo izquierdo.

En lo que respecta a la serología para *B. ovis*, se presentó positiva a los 14 días de la inoculación en un borrego, otros dos resultaron positivos a los 28 días y dos se mantuvieron negativos durante todo el experimento. De estos animales negativos (866, 880), en el primero se aisló la bacteria y en el otro no, coincidentemente los animales con serología negativa presentaron al examen clínico lesiones palpables de baja intensidad en el lugar de inoculación. Sobre este aspecto Worthington y Cordes (1981) y Worthington *et al.*, (1985) mencionan la ocurrencia de falsos negativos en animales crónicamente infectados o en aquellos que se encuentran en periodo de incubación de la enfermedad. En este experimento, los animales se mantuvieron por cinco semanas, este tiempo pudo resultar insuficiente para detectar animales positivos a la prueba de inmunodifusión doble con extracto salino caliente. Esta prueba es considerada de alta especificidad (100%) y adecuada para el diagnóstico. A este respecto, Marin *et al.*, (1989) encontraron serología positiva en 81 animales a la prueba de ELISA indirecta, 80 a la IDD y 77 a la prueba de FC en 83 animales bacteriológicamente positivos a *B. ovis*. En animales infectados con *B. ovis* por vía prepucial, se detectó positividad a la prueba de FC entre las 2 y las 9 semanas y entre las 8 y las 10, para la prueba de hemoaglutinación indirecta IHA (Webb *et al.*, 1980), ambas consideradas de mayor sensibilidad que la IDD. Biberstein *et al.*, (1963) luego de la inoculación por instilación conjuntival de *B. ovis*, lograron demostrar títulos, a partir de los 9 días post infección con la prueba de FC. Los resultados fundamentan la necesidad de ser cautelosos en el diagnóstico serológico de la enfermedad.

Cameron y Lauerman (1976) encontraron variación en el patrón de eliminación de *B. ovis* en el semen de borregos inoculados por vía prepucial, tres presentaron patrones con aislamientos constantes, en los que se recuperó la bacteria en la mayoría de los muestreos, lográndose 11 y 12 aislamientos de 15 muestreos. El segundo patrón se presentó en dos animales en los cuales en uno se logró aislar solo 1 vez y en otro 6 veces en igual número de muestreos. En todos se aisló la bacteria del aparato reproductor en la necropsia. Por otro lado el no utilizar un medio selectivo como el Thayer-Martín, el lento crecimiento de las colonias de *B. ovis*, la presencia de bacterias contaminantes y el bajo número y la forma intermitente en que se elimina *B. ovis* en el semen (Webb *et al.*, 1980), pueden explicar los pocos aislamientos del semen de los borregos este trabajo, 5 de 10 considerando los grupos inoculados con *B. ovis* y *B. ovis* - *A. seminis*.

En el grupo inoculado con *A. seminis* y *B. ovis*, se lograron aislar en dos animales *B. ovis*, en otros dos *A. seminis* y en otro ambos, del punto de inoculación. En los testículos de los epidídimos inoculados, no se lograron aislamientos de *A. seminis*, pero en dos animales se logró aislar *B. ovis*, de estos dos testículos, uno presentaba lesiones degenerativas y otro lesiones inflamatorias con infiltración linfocitaria. En los animales en que se aisló *A. seminis* (886, 898) las lesiones palpables en la cola del epidídimo fueron de baja intensidad, mientras en los que se aisló *B. ovis* (852, 910) resultaron de mayor gravedad, además se presentó pérdida del tono testicular y disminución de tamaño del órgano.

En el borrego 889 del cual se aislaron ambos patógenos de la cola del epidídimo y *B. ovis* del testículo, la lesión en la cola del epidídimo fue calificada como la de mayor intensidad, además ocurrió disminución del tamaño testicular. Llama la atención que en este borrego, el aislamiento de *B. ovis* fue en el testículo ipsilateral a la cola inoculada, sin presencia de procesos inflamatorios, solo constatándose degeneración testicular, que pudo ser consecuencia de la lesión epididimal. La presencia de aislamientos de *B. ovis* sin lesión en el aparato genital es descrita por Searson (1987). En el animal 889 se constató aumento de tamaño en la cabeza del epidídimo derecho, por lo cual se realizó la bacteriología, resultando los cultivos negativos. Sin embargo a la histopatología, se encontró un granuloma espermático, que se asoció con lesiones histopatológicas en la cola del epidídimo y testículo del mismo lado. El hallazgo de lesiones granulomatosas en la cabeza del epidídimo, sin aislamiento bacteriológico, ha sido descrito por Walker *et al.*, (1986) quienes las atribuyen a la presencia de obstrucciones congénitas de los conductos eferentes. Estas lesiones sin embargo, no fueron detectadas en el examen previo a la

inoculación, lo que permite atribuir las a la inoculación experimental y al posible desarrollo de lesiones autoinmunes.

Se encontró en este grupo, inoculado con *A. seminis* y *B. ovis*, que 4/5 resultaron positivos a serología para *B. ovis*. La primera seroconversión para *B. ovis* se produjo en el animal 910, a la semana de la inoculación, es destacable que en éste animal se aisló la bacteria de testículo, epidídimo y del semen en tres ocasiones. El animal 839, seroconvirtió a la 2ª semana, manteniéndose positivo hasta el último muestreo. En dos borregos, se presentó seroconversión que se revierte en el periodo de estudio (852 y 886). El 898 resultó negativo no pudiéndose recuperar *B. ovis* pero sí *A. seminis*. Resultó interesante el hecho que en el 886 del cual se recuperó *A. seminis*, resultó negativo a la IDD para *A. seminis* y positivo en la IDD para *B. ovis*.

En la serología para *A. seminis*, resultaron 1/5 positivo y 2/5 dudosos. Es de destacar que el borrego que tuvo reacción positiva, lo hizo a la 5ª semana y mostró reacciones dudosas en los muestreos de la 3ª y 4ª semana, de este animal se aisló *A. seminis*, del semen y del lugar de inoculación. El animal 852 presentó reacciones dudosas en la 3ª y 4ª, no se aisló *A. seminis* de las muestras de semen, ni de la bacteriología que se realizó a los órganos del aparato genital. En el animal 889 se logró el aislamiento pero la serología resultó negativa. Estas observaciones resultaron similares a las realizadas por Méndez *et al.*, (1999) en estudios de campo, en los cuales se encontraron animales con serología negativa asociada con el aislamiento del patógeno o serología positiva sin aislamiento. Es de destacar que estos autores utilizaron antígenos y técnicas similares a las de este trabajo. No se puede descartar que las reacciones dudosas se deban al cruce antigénico con bacterias relacionadas, sin embargo en algunos casos antecedieron a reacciones claramente positivas.

Cuadro: 8.5

Experimento III Inoculación intraepididimal con *A. seminis* y *B. ovis*

Resumen

Inóculo	n°	Aislamientos en órganos de <i>A. seminis/B. ovis</i>		Aislamientos en semen de <i>A. seminis/B. ovis</i>	Presencia de (Macro y PMN) en semen	Serología	Bacteriología y Patología de los órganos del aparato reproductivo						Localización de las alteraciones en el examen clínico
		<i>A. seminis</i>	<i>B. ovis</i>				TI	CEI	TD	CED	CaEI	CaED	
<i>B. ovis</i> Cola Epid. Izq.	839		CEI	<i>B.o</i>	+	p	-	<i>B.o</i>	-	-	*	*	CEI+++ y CaED+
	841		CEI, TI	<i>B.o</i>	+	p	X	<i>B.o</i>	-		*	*	CEI++
	857		CEI, CaEI, TI	s	+	p	X	<i>B.o</i>	-	-	<i>B.o</i>	*	CaEI+++
	866		CEI	s	+	n	-	<i>B.o</i>	BFG	BFG	BFG	*	CaED e I++++, CuED e I++ ,CEI+
	880		-	s	+	n	-	<i>B.o</i>	-	-	*	*	CEI+
<i>A. seminis/B. ovis</i> Cola Epid. Izq.	852	-	CEI	<i>B.o</i>	+	±/p	-	<i>B.o</i>	-	-	*	*	CEI++++ y TI++
	886	CEI	-	<i>A.s</i>	+	-/p	-	<i>A.s</i>	-	-	*	*	CEI+
	889	CEI	CEI, TI	<i>A.s/B.o</i>	-	-/p	<i>B.o</i>	<i>A.s</i>	-		*		CEI++++ ,TI++ y CaED+
	898	CEI	-	<i>A.s</i>	-	+/n	-	<i>A.s</i>	-		*	*	CEI+
	910	-	CEI, TI	<i>B.o</i>	+	-/p	X	<i>A.s</i>	-	-	*	*	CEI+++ y TI++
<i>A. seminis</i> Cola Epid. Izq.	930	CEI		<i>A.s</i>	+	+	+	<i>A.s</i>	*	*	*	*	CEI++++ y TI++
	934	-		s	+	±	-	<i>A.s</i>	*	*	*	*	CEI+++ y TI++
	938	-		<i>A.s</i>	+	+	X	<i>A.s</i>	*	*	*	*	CEI++++ y TI+++

C cola, Ca cabeza, E epididimo
T testiculo, D derecho, I izquierdo

Grado de lesión de+ a ++++

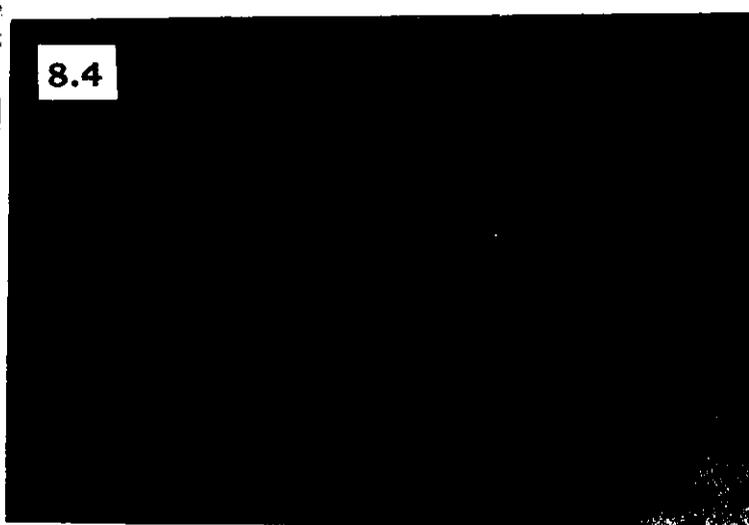
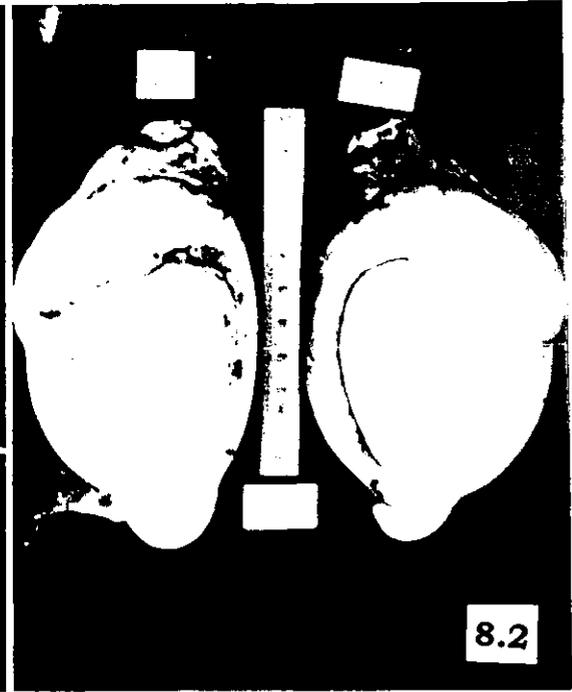
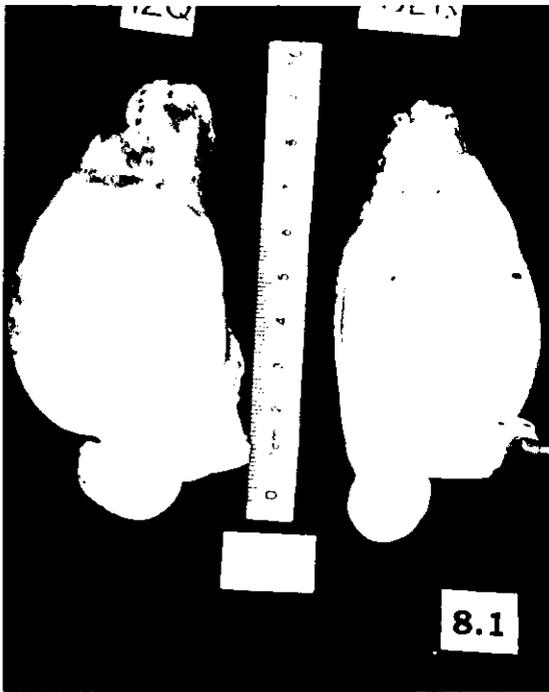
s-sospechosas por ser bacilos pleomórfico Gram (-) descartadas,
por pruebas bioquímicas o PCR

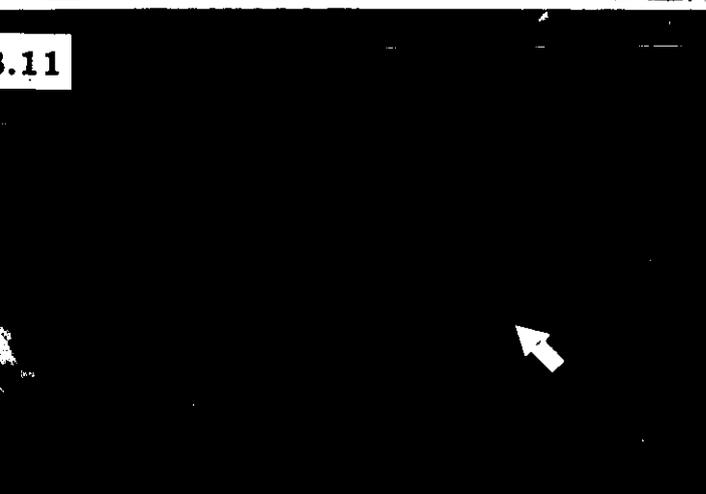
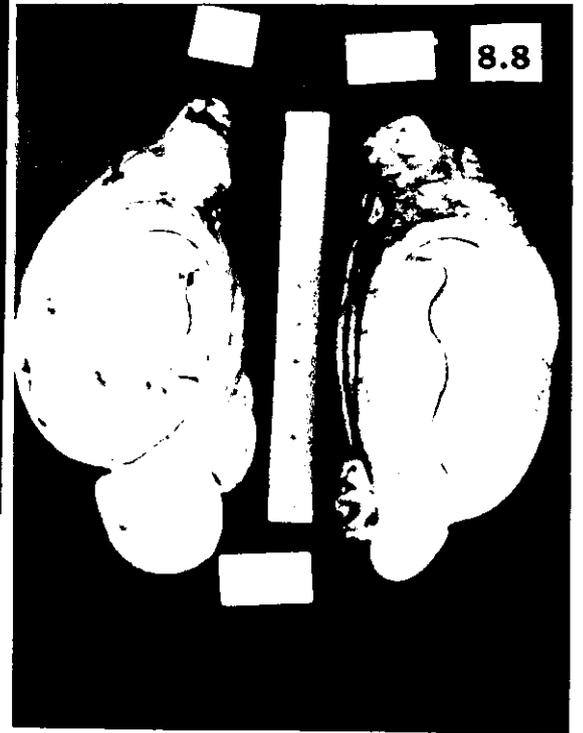
p-positivo a la IDD para *B. ovis*
n-negativo a la IDD para *B. ovis*
+ positivo a la IDD para *A. seminis*
- negativo a la IDD para *A. seminis*
± dudoso a la IDD para *A. seminis*

	Degeneración testicular
	Degeneración testicular e infiltración linfoplasmocitaria
	Granuloma espermático
	Presencia de infiltrados inflamatorios (PMN, Linfocitos, Macrófagos)
	Presencia de alteraciones en epitelio(Hiperplasia, Vesículas intraepiteliales, Metaplasia)
	Sin alteraciones patológicas
	No determinado: se estudiaron algunas con alteraciones evidentes

Experimento III

- 8.1 Animal 841. Lesión en la cola del epidídimo izquierdo de dos cruces.
- 8.2 Animal 866. Aumento de tamaño de ambos cuerpos y cabezas del epidídimo y asimetría en las colas.
- 8.3 Animal 839. Cola epidídimo izquierdo. Granuloma espermático. Nótese los espermatozoides compactados y la proliferación fibrosa rodeando el cuadro. HE x 40
- 8.4 Animal 839. Cola epidídimo izquierdo. Granuloma espermático. Células epitelioides y células multinucleadas (→) (macrófagos modificados). HE x 400
- 8.5 Animal 841. Cola epidídimo izquierdo. Epididimitis. Vista panorámica en la que se aprecian las alteraciones epiteliales, infiltración linfoide intersticial y la presencia de espermatozoides y células inflamatorias en el interior de los túbulos. HE x 40
- 8.6 Animal 857. Cabeza del epidídimo. Granuloma espermático. Vista panorámica donde se observan a la derecha, los espermatozoides compactados seguidos (a) hacia la izquierda por una zona con células epitelioides (b) y fibrótica (c). Observándose en el extremo izquierdo un corte del túbulo con leve hiperplasia. HE x 40
- 8.7 Animal 857. Cabeza del epidídimo. Granuloma espermático. Detalle de la zona de células epitelioides donde se aprecian espermatozoides en el interior de las mismas (⇔). HE x 400
- 8.8 Animal 889. Nótese el tamaño de la cola izquierda en comparación con la derecha. Lesión de cuatro cruces.
- 8.9 Animal 852. Nótese la disminución de tamaño del testículo izquierdo, el aumento de tamaño de la cola izquierda y la presencia de adherencias con la túnica blanca.
- 8.10 Animal 898. Cola del epidídimo izquierdo. Presencia de vesículas intraepiteliales. HE x 100
- 8.11 Animal 910. Cola epidídimo izquierdo. Granuloma abscedativo. Nótese la pérdida del epitelio epididimal (⇔), el interior del túbulo se encuentra lleno de PMN y la reacción fibroblástica en la periferia. HE x 200
- 8.12 Animal 910. Testículo izquierdo. Infiltración linfoide intersticial focal y degeneración testicular. HE x 100





9. CONFIRMACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS DE *A. seminis* por PCR.

Se aplicó la técnica de PCR ribotipo, como método confirmatorio del diagnóstico bacteriológico de *A. seminis*. Se utilizaron los iniciadores y la técnica descrita por Appuhamy (1998-) todos los aislamientos que se dan como positivos fueron confirmados por esta técnica. En todos los aislamientos que resultaron positivos se observaron dos bandas coincidentes con la del control (ADN de la cepa de referencia) de 0.55kb y 0.7kb, no detectándose en ningún caso la banda de baja intensidad descrita por el autor de 0.85kb.

10. DISCUSION GENERAL Y CONCLUSIONES

Al menos en un caso la vía IU permitió la colonización y permanencia de *A. seminis* en las vesículas seminales y ámpulas del deferente de un animal (1/11) (experimento I). La vía IE permitió la permanencia y aislamiento de la bacteria de la cola del epidídimo inoculada 4/8 (experimentos I y III) a los 35 días de la inoculación, a pesar de encontrarse lesiones de epididimitis en todos; esta vía permitió recuperar la bacteria de las vesículas seminales en 1/3, de las ámpulas del deferente en 2/3 y de las bulbouretrales en 1/3 (experimento I). También en el experimento II, en los cuatro animales no se pudo recuperar a bacteria de las colas del epidídimo correspondientes a los conductos deferentes inoculados. De los dos borregos con el conducto deferente ligado, en aquel en que se pudieron estudiaron las glándulas anexas tampoco fue posible recuperar *A. seminis* de las mismas (003). En los dos en los que no se ligó el conducto deferente, en 1/2 se aisló del conducto deferente, vesículas seminales y glándulas bulbouretrales y en ambos, de las ámpulas del deferente.

La falla en la recuperación de *A. seminis* en muchos de los animales, puede ser debida a su rápida eliminación, por la intensa reacción inflamatoria. Dos animales en los cuales se aisló *A. seminis* de las colas epididimales en el experimento III, no presentaron cambios inflamatorios intensos ni al examen clínico ni a la histopatología. Respuestas de baja intensidad, también estuvieron presentes en las glándulas anexas de donde se aisló *A. seminis*. El otro factor a considerar es el tiempo transcurrido entre la inoculación y el sacrificio, 20 días en el experimento II y 35 para los experimentos I y III.

Es importante señalar que en el animal 938, al que se inoculó la bacteria intraepididimal, no se logró aislar del epidídimo inoculado, pero sí en cultivo puro, de las ámpulas deferentes, hallazgos similares se han reportado en casos clínicos (Baynes y Simmons 1960; Simmons *et al.* 1966). Igualmente los hallazgos de los experimentos I y II señalan a las glándulas anexas como un lugar común de asentamiento y permanencia de *A. seminis*, desde donde en diferentes circunstancias, podría movilizarse a otras partes del aparato reproductivo o facilitarse su excreción seminal. A este respecto, en animales inmunizados contra *H. ovis* y desafiados por vía intraepididimal e intradeferente se constató la eliminación de la bacteria de la cola del epidídimo, pero en el caso de la inoculación intradeferente las bacterias permanecieron en algunos casos en el conducto deferente, en las vesículas seminales y en las ámpulas del deferente. Estos hechos se

atribuyeron a la intensa respuesta inflamatoria debida a la mayor destrucción tisular producida en la inoculación intaepididimal si se la compara con la de la inoculación intradeferente, en este último caso las bacterias permanecieron en el lugar facilitando la reinfección de las glándulas anexas (Jansen y Hayes, 1984). Sin embargo, es difícil saber lo que ocurre con las glándulas anexas en esta infección; ya que en muchos trabajos clínicos y experimentales no se estudian (Trejo *et al.* 1986; Walker *et al.* 1986; Pérez *et al.* 1988; Méndez *et al.* 1999; de la Puente Redondo *et al.* 2000). También en los estudios de prevalencia en el semen (van Tonder 1979; De Wet y Erasmus 1984; Low *et al.* 1995) se correlacionan los hallazgos bacteriológicos con las lesiones epididimales, pero no se evalúan las glándulas anexas, presumiblemente por la necesidad de sacrificar los animales para su estudio.

Es de resaltar la gran variedad de bacterias presentes en el aparato reproductivo asociadas a lesiones de diversa intensidad. Van Tonder (1979_a), sostiene que la esporádica e irregular aparición de una variedad de bacterias en el semen, relacionadas con lesiones crónicas, indicarían que los microorganismos no son de importancia primaria. Lo anterior también se confirma por el hecho de que a pesar que estos microorganismos sean aislados en gran número y en cultivos puros, no se asocian con la presencia de células inflamatorias en el semen o lesiones en el aparato reproductor. En los garañones también se han detectado la presencia de bacterias potencialmente patógenas en semen y uretra, como *Pseudomonas aureoginosa* y *Klebsiela pneumoniae* sin alterar la fertilidad y con la presencia de escasas células inflamatorias (Malmgren *et al.*, 1998). La microflora encontrada en el semen de humanos estériles, *Staphylococcus* y enterobacterias, se caracterizó por presentar alta adhesividad, actividad antilisosímica aumentada y resistencia a los antibióticos, todas características que posibilitan la colonización y permanencia en el aparato reproductivo (Kuz'min *et al.*, 1998) sin embargo la presencia de bacterias en semen y su relación con infertilidad resulta controversial.

La producción de estrógenos por parte de células de Leydig y Sertoli esta suficientemente documentada, en trabajos recientes se encuentra la enzima aromatasasa en las células germinales y espermatozoides. Estos estrógenos actuarían sobre las células epiteliales del conducto deferente y el epidídimo, en los cuales se presentan receptores estrogénicos alfa, y estimularían los fenómenos de reabsorción. En ratones carentes de estos receptores se presenta transformación escamosa del epitelio con ausencia de lisosomas y organelos endocíticos (Hess, 2000), también se presentan receptores en los órganos sexuales accesorios durante la el período prepuberal en ratas (Dhar *et al.*, 1998), estos cambios hormonales podrían provocar la aparición de receptores que facilitarían la colonización de las bacterias. En muchos trabajos se presenta la pubertad como un momento clave en el desarrollo de patologías reproductivas. Bulgin (1990) plantea para la infección de *B. ovis*, la transmisión intrauterina o a través de la leche, pero el desarrollo de la enfermedad ocurriría pocos meses después de la entrada a la pubertad, en borregos que se mantuvieron sin contacto con adultos. En el mismo sentido Cavalieri y Van Camp (1997) expresan una mayor incidencia de seminovesiculitis en toros jóvenes peripuberales.

Poco es lo que se sabe de respuesta inmune local mediada por Ig A secretora y su acción antimicrobiana en el tracto reproductor de los borregos; en los humanos se presenta inmunotinción en la próstata, en las glándulas uretrales, resultando negativos el epitelio del conducto deferente, las vesículas seminales, el ámpula del deferente, y las glándulas bulbouretrales, por lo cual los autores manifiestan que la respuesta inmune mediada por Ig A secretora es baja en el aparato genital del humano (Sirigu *et al.*, 1995).

Se encontraron cambios degenerativos a nivel testicular en los tres experimentos coincidentes con alteraciones epididimales, sin embargo la valoración de estos se hace difícil, por tratarse de animales de 24 semanas, los cuales se encuentran entrando a la pubertad. Se ha mencionado la imposibilidad de distinguir en animales de esta edad, si se tratan de cambios degenerativos, hipoplásicos o se trata de animales que no han alcanzado la pubertad en forma plena, esto significa que si bien producen espermatozoides (se observan espermátidas alargadas en algunos los túbulos seminíferos) estos no se encuentran en cantidad suficiente para fertilizar a una hembra (Watt 1978; Jubb *et al.* 1985). Existen estudios en borregos Corriedale en condiciones extensivas, en los cuales entre los 180 y 216 días la gran mayoría de los animales presentaban en los cortes testiculares espermátidas alargadas (38/40), lo que significa que habían

completado la espermatogénesis (Castrillejo *et al.*, 1995). Considerando estos datos y el peso corporal promedio de los animales empleados, se puede suponer que la mayoría de ellos deberían haber completado la espermatogénesis lo que no fue posible observar en todos los casos, atribuyendo estos hallazgos al proceso inflamatorio ocurrido a nivel epididimal o testicular, que se hacen más claros si se los compara con la condición del testículo contralateral. Además, se consideraron en el diagnóstico de degeneración testicular la presencia de células multinucleadas de meiosis aberrantes, que son un signo claro de procesos degenerativos. Por otro lado, las células inflamatorias presentes en los testículos fueron linfocitos; ya sea cuando se aisló *B. ovis* (841,877,910) o cocos Gram (+) (859) o aun cuando resultaron negativos al aislamiento (938). Este tipo de infiltrado puede responder a un proceso inflamatorio crónico provocado por un agente infeccioso, pero también está presente en los cambios degenerativos a nivel testicular, provocados por procesos obstructivos en la cabeza o la cola del epidídimo (Jubb *et al.*, 1985). En ningún caso se observaron procesos supurativos en los testículos.

Conclusiones:

- El tratamiento hormonal no permitió el aislamiento del aparato reproductivo de *A. seminis* inoculado por vía intrauretral, pero si se detectaron otras bacterias en el aparato genital, principalmente en las glándulas anexas y lesiones en el aparato reproductivo en 3 de los 4 borregos.
- La lesión en la cola del epidídimo provocada por el etilenglicol no permitió la instalación de la bacteria en la misma.
- Se encontraron lesiones en la cola del epidídimo luego de la inoculación de *A. seminis* y *B. ovis*, pese a que en muchos de los casos no fue posible recuperar las bacterias en los estudio bacteriológicos. Las lesiones tuvieron similares características histopatológicas y se asociaron con degeneración testicular.
- Fue posible aislar *A. seminis* de las glándulas anexas en casos en que resultó negativo el aislamiento del epidídimo a pesar de presentar lesiones. La inoculación intradefrente sin ligadura, permitió la instalación de las bacterias en las glándulas anexas. Por lo tanto las glándulas anexas pueden ser consideradas como un lugar de reservorio de *A. seminis* en el aparato reproductor del borrego.

- En las glándulas anexas fue posible encontrar lesiones histopatológicas de poca intensidad coincidentes con el hallazgo de cocos Gram (+) y bacilos Gram (-).
- La mayoría (75 %) de los animales de los que se aisló *A. seminis* del semen, presentaron células inflamatorias en el semen.
- La prueba de IDD con antígeno soluble, dio resultados positivos en 5 de los 19 animales inoculados por las diferentes vías (26 %), dando reacciones dudosas en otros 5 (26 %).

Una observación crítica de los resultados lleva a pensar que el término de “Epididimitis de los carneros” no define en forma correcta la condición patológica que afecta a los carneros, ya que en muchos las glándulas anexas están también afectadas o incluso el mismo testículo, sin la presencia de alteraciones en el epidídimo, como ocurrió en el animal 856, o las lesiones epididimales coinciden con alteraciones presentes también en las glándulas anexas como en los borregos 938 y 930.

BIBLIOGRAFIA

- Ajai CO, Cook JE, Dennis SM. Diagnosing ovine epididymitis by immunofluorescence. *Vet. Rec* 1980;107:421-424.
- Alsenosy AM, Dennis SM. Pathology of acute experimental *Actinobacillus seminis* mastitis in ewes. *Aust Vet J* 1985;62:234-237.
- Appuhamy S, Coote JG, Low JC, Parton R. PCR methods for identification and characterization of *Actinobacillus seminis* stains. *J Clin Microbiol* 1998_a;36:814-817.
- Appuhamy S, Low JC, Parton R, Coote JG. Specific PCR primers from the 16S-23S rRNA spacer region for the rapid detection and identification of *Actinobacillus seminis*. *J Appl Microbiol* 1998_b;85:941-948.
- Bagley CV, Paskett ME, Matthews NJ, Stenquist NJ. Prevalence and causes of ram epididymitis in Utah. *J Am Vet Med Ass* 1985;18: 798-801.
- Baynes ID, Simmons GC. Clinical and pathological studies of Border Leicester rams naturally infected with *Actinobacillus seminis*. *Aust Vet J* 1968;44:339-343.
- Baynes ID, Simmons GC. Ovine epididymitis caused by *Actinobacillus seminis*. *Aust Vet J* 1960;36:454-459.
- Beeman KB, Hummels S, Rahaley R. Epididymitis in rams. *Agri Practice (Veterinary medicine/ Small animal clinican)* 1982:november;1647-1650.
- Bergey's. *Manual of systematic bacteriology*. Ed. Williams and Wilkins. USA. 1986. pag. 570-575.
- Biberstein EL, McGowan B, Robinson EA, Harrold DR. Epididymitis in rams. Studies on immunity. *Cornell Vet* 1962;52:215-227.
- Biberstein EL, McGowan, Olander H, Kennedy PC. Epididymitis in rams studies on pathogenesis. *Cornell Vet* 1964;54:27-41.
- Brown GM, Pietz DE, Price DA. Studies on the transmission of *B. ovis* infection of rams. *Cornell Vet* 1973;63:29-40.,
- Bulgin MS. *Brucella ovis* epizootic in virgin ram lambs. *J Am Vet Med Ass* 1990;196:120-122
- Bulgin MS, Anderson BC, Kirk JH. Ram Epididymitis. *Proc Ann Mtg Soc Therio* 1981;173-179.
- Bulgin MS, Anderson BC. Association of sexual experience with isolation of various bacteria in cases of ovine epididymitis. *J Am Vet Med Ass* 1983;182:372-374.
- Bulgin MS, Bruss ML, Anderson BC. Methods for control of lamb epididymitis in large purebred folks. *J Am Vet Med Ass* 1990;196:1110-1115.
- Burgess GW. Ovine contagious epididymitis: a review. *Vet Microbiol* 1982;7551-575.
- Cameron RDA, Lauerman LH. Characteristic of semen changes during *Brucella ovis* infection in rams. *Vet Rec* 1976;99:231-233.
- Cárdenas L, Maki LR. Detection of antibody in rams with contagious epididymitis, using the enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Vet Res* 1986;47; 738- 739.
- Castrillejo A, Moraña A, Bielli A, Gastel T, Molina JR, Forsberg M, Rodriguez-Martinez. Onset of spermatogenesis in Corriedale rams lams under extensive rearing conditions in Uruguay. *Acta vet Scand* 1995;36;161-173.
- Cavaliere J, Van Camp SD. Bovine seminal vesiculitis. A review and update. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1997;13;233-241.
- Cousins DV, Lloyd JM. Rapid Identification of *Haemophilus somnus*, *Histophilus ovis* and *Actinobacillus seminis* using the APIZYM sistem. *Vet Microbiol* 1988;17:75-81.
- De la Puente-Redondo VA, Garcia BN, Perez MC, Gonzalez RMC, Rodriguez FEF, Gutierrez MCB. Isolation of *Actinobacillus seminis* from the genital tract of rams in Spain. *J Comp Pathol* 2000;122:217-222.

- De Long WJ, Waldhalm DG, Hall RF. Bacterial isolates associated with epididymitis in rams from Idaho and Eastern Oregon flocks. *Am J Vet Res* 1979;40:101-102.
- De Wet JAL, Erasmus JA. Epididymitis of rams in the Central and Southern districts of the Orange Free State. *J S Afr Vet Ass* 1984;55:173-179.
- Dhar JD, Mishra R, Setty BS. Estrogen, androgen and antiestrogen responses in accessory organs of male rats during different phases of life. *Endocr Res* 1998;24:159-169.
- Dostál J, Veselský L, Drahorád J, Jonáková V. Immunosuppressive effect induced by intraperitoneal and rectal administration of boar Seminal Immunosuppressive Factor. *Biol Reprod* 1995;52:1209-1214.
- Dostál J, Veselský L, Marounek M, Zelezná, Jonáková V. Inhibition of bacterial and boar epididymal sperm immunogenicity by boar seminal immunosuppressive component in mice. *J Reprod Fertil* 1997;111:135-141.
- Ekdahl MO, Money DFL, Martin CA. Some aspects of epididymitis of rams in New Zealand. *N Z vet J* 1968;16:81-82.
- Erasmus JA, De Wet JAL, Prozesky L. *Actinobacillus seminis* infection in Walrich ram. *S Afr Vet Ass* 1982;53:129.
- Erlich HA, editor. PCR Technology, Principles and Applications for DNA Amplification. Ed Stockton press.USA. 1989. pag 8-16.
- Ficapal A, Jordana J, Blasco JM, Moriyón I. Diagnosis and epidemiology of *Brucella ovis* infection in rams. *Small Rum Res* 1998;29:13-19.
- Foster G, Collins MD, Lawson PA, Buxton D, Murray FJ, Sime A. *Actinobacillus seminis* as a cause of abortion in UK sheep folck. *Vet Rec* 1999;144:479-480.
- Foster RA, Ladds PW, Briggs GD, Hoffmann D. Pathology of the accessory sex glands of rams infected with *Brucella ovis*. *Aust Vet J* 1987;64:248-250.
- Genetzky RM. Epididymitis in Rams. *The Compendium Food Animal* 1995;17:447-454.
- Groom SC, Hazlett MJ, Little PB. An evaluation of the APIZYM system as a means of identifying *Haemophilus somnus* and related taxa. *Can J Vet Res* 1986;50:238-244.
- Hafez ESE. Reproduction in farms animals. 6ed. Ed. Lea & Febiger. USA. 1993. pag 177, 402-404.
- Healey MC, Gharpure HM, Kleinschuster SJ, Hwang HH, Johnston AV. Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies to *Actinobacillus* sp isolated from epididymitis lesions in a ram. *Am J Vet Res* 1985;46:1297-1302.
- Healey MC, Gharpure HM, Kleinschuster SJ, Hwang HH, Johnston AV. Use of monoclonal antibodies to identify outer membrane antigens of *Actinobacillus* species. *Am J Vet Res* 1986;47:1446-1451.
- Healey MC, Hwang HH, Elsner YY, Johnston AV. A model for demonstrating the adhesion of *Actinobacillus seminis* to epithelial cells. *Can J Vet Res* 1991;55:121-127.
- Healey MC, Hwang HH, Kleinschuster SJ, Johnston AV, Symons KS. Comparison and partial characterization of the protein profiles and outer membrane antigens of *Actinobacillus* species isolated from ram lambs with epididymitis. *Am J Vet Res* 1988;49:1824-1831.
- Heath PJ, Davies JH, Morgan, Aitken IA. Isolation of *Actinobacillus seminis* from rams in the United Kingdom. *Vet Rec* 1991; 129:304-307.
- Hess RA. Oestrogen in fluid transport in efferent ducts of the male reproductive tract. *Rev Reprod* 2000;5:84-92.
- Jackson PGG, White RAS. Epididymitis in a goat. *Vet Rec* 1982; 111:81-82
- Jansen BC, Hayes M. Immunity against genital infection by *Histophilus ovis* in rams. *Onderstepoort J vet Res* 1984;51:203-207.
- Jansen BC. The epidimiology of bacterial infection of the genitalia in rams. *Onderstepoort J Vet Res* 1983;50:275-282.

- Jansen BC. The aetiology of rams epididymitis. Onderstepoort J vet Res 1980_a;47:101-107.
- Jansen BC. The pathology of bacterial infection of the genitalia in rams. Onderstepoort J vet Res 1980_b;47:263-267.
- Jansen BC. A surgical technique for the experimental reproduction of epididymitis in rams. Onderstepoort J vet Res 1980_c;47:281-283.
- Jansen MA, Webster JA, Stratus N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. Appl Environ Microbiol 1993;59:945-952.
- Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N. Pathology of domestic animals. 3^{ra} ed. Ed. Academic Press, INC. San Diego, California, USA, 1985. pag 420-426.
- Korostoff J, Wang JF, Kieba I, Miller M, Shenker BJ, Lally ET. *Actinobacillus actinomycetencomitans* Leukotoxin induces apoptosis in HL-60 cells. Infect Immun 1998;66:4474-4483.
- Kuz'min MD, Ivanov IUB, Mikhailova EA, Bukharin OV. The role of persisting microflora in the development of pathospermia. Urol Nefrol (Mosk) 1998;2:46-48.
- Laws L, Simmonds GC, Ludford CG. Experimental *Brucella ovis* Infection in rams. Aust Vet J 1972;48:313-317.
- Ley WB. Ram Epididymitis. Agri-Practice-Ovine Reproduction 1993;14:34-37
- Livingston CW, Hardy WT. Isolation of *Actinobacillus seminis* from ovine epididymitis. Am J Vet Res 1964;25:660-663
- Low JC, Somerville D, Mylne JA, Mckelvey WAC. Prevalence of *Actinobacillus seminis* in the semen of rams in the United Kingdom. Vet Rec 1995;136:268-269
- Lozano EA. Etiologic significance of bacterial isolates from rams with palpable epididymitis. Am J Vet Res 1986;47: 1153-1156.
- Marin CM, Jimenez-de Begues MP, Blasco JM, Gamazo C, Moriyon UI, Diaz R. Comparison of three serological tests for *Brucella ovis* infection of ram using different antigenic extracts. Vet Rec 1989;125:504-508.
- Malmgren L, Olsson EE, Engvall A, Albin A. Aerobic bacterial flora of semen and stallion reproductive tract and its relation to fertility under field conditions. Acta Vet Scand 1998;39:173-183.
- Mbai K, Munyua SJM, Gathumbi PK, Mbiuki SM. *Actinobacillus seminis* as a cause of ram infertility in Kenya. Small Rum Res 1996;21:227-231.
- Mc Donald LE, Pineda MH. Veterinary endocrinology and reproduction. 4^{ta} ed. Ed. Lea & Febinger. Philadelphia. USA. 1989. pag 261-295.
- Mc Faddin JF. Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed Médica Panamericana. México D.F. 1990.
- Mc Gillivray DJ, Webber JJ, Dean HF. Characterization of *Histophilus ovis* and related organisms by restriction endonuclease analysis. Aust Vet J 1986;63:389-393.
- Mc Gillivray DJ, Webber JJ. Genetic homogeneity of *Actinobacillus seminis* isolates. Res Vet Sci 1989;46:424-425.
- Méndez NG, Díaz AE, Morales JF, Aguilar RF, Suárez GF. Epididimitis ovina: estudios bacteriológicos y serológicos. Vet Mex 1999;30:329-336.
- Miles AA, Misra SS, Irwin JO. The estimation of the bactericidal power of the blood. J Hyg 1938;38:732-734.
- Moore HDM, Bedford JM. Short-term effect of androgen withdrawal on the structure of different epithelial cells in the rat epididymis. Anat Rec 1979;193:293-312.
- Núñez TE, Díaz AE. "Diagnóstico de *Brucella ovis*" en Diagnóstico de Brucellosis animal. Ed. INIFAP-SAGAR, México DF, México, 1998. pag 90-94.
- Otrowski, JEB. "Diagnóstico de fertilidad en el carnero" en Miscelánea N°4. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria Centro Regional Patológico. Treleu-Chubut, Argentina, 1962.

- Oviedo FC, Hernandez VC, Hernandez GS, Reyes GA. Epididimitis ovina (*Brucella ovis*). Diagnóstico, Prevalencia y descripción en el Estado de México. Memorias del 1° Congreso Nacional de Producción ovina. La Calera, Zacatecas. México. Marzo de 1988.
- Pérez EM, Flores CR, De la Higuera JA, Trigo TFJ. Diagnóstico y descripción de un brote de epididimitis ovina en México originado por *Brucella ovis*. Veterinaria FMVZ UNAM 1979;10:221-226.
- Pérez PM, Trejo GO, Alvarez MCI, Tórtora PJ. Epididimitis ovina, encuesta de rastro, hallazgos patológicos y aislamientos bacterianos. 1er Congreso Nacional de Producción Ovina, AMTEO, México, 1988.
- Plant JW, Eamens GJ, Seaman JT. Serological, bacteriological and pathological changes in rams following different routes of exposure to *Brucella ovis*. Aust Vet J 1986;63:409-412.
- Rahaley RS, Dennis SM. Histopatology of experimental brucellosis in rams following vaccination with *Brucella ovis*. Aust Vet J 1984;61:353-356.
- Rahaley RS. Serological comparison between *Histophilus ovis*, *Actinobacillus seminis* and *Brucella ovis*. Aust Vet J 1978;54:423-425
- Saravanamuthu V, Foster RA, Ladds PW, Gorrell MD. T and B Lymphocyte subsets in spermatic granulomas in five rams. Vet Pathol 1991;28:482-491.
- Sargison ND, Scott PR, Colin DP, Scott PR. Spermatic granulomas in vasectomized ram. Can Vet J 1995;36:383-384.
- Scanlan CM, Healey MC, Torres AR, Johnston AV. Cultural and biochemical characterization of *Actinobacillus* and *Actinobacillus*-like species from ram lambs with epididymitis. J Vet Diagnost Invest 1989;1:288-294.
- Scanlan CM. Etiopathogenesis of epydidymitis in ram lambs. Memorias del 5° Congreso Nacional de Producción ovina. Monterrey, Nuevo León, México. 1 al 4 de abril de 1992.
- Schaller A, Kuhnert P, de la Puente-Redondo VA, Nicolet J, Frey J. Axp toxins in *Pasteurellaceae* species from animals. Vet Microbiol 2000;74:365-376.
- Searson JE. Distribution of *Brucella ovis* in the tissues of rams reacting in a complement fixation test for ovine brucellosis. Aust Vet J 1986;63:30-31.
- Searson JE. Sensitivity and specificity of two microtitre complement fixation test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. Aust Vet J 1982;58:5-7.
- Searson JE. The distribution of histopathological lesions in rams reacting in a complement fixation test for *Brucella ovis*. Aust Vet J 1987;64:108-109.
- Sellwood R, Gibbons RA, Jones GW, Rutter JM. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to pig intestinal brush borders: the existence of two pig phenotypes. J Med Microbiol 1975;8:405-411.
- Sirigu P, Perra MT, Turno F. Immunohistochemical study of secretory IgA in the human male reproductive tract. Andrología 1995;27:335-339.
- Simmons GC, Baynes BV, Ludford B. Epidemiology of *Actinobacillus seminis* in a folk of Border Leicester sheep. Aust Vet J 1966;42:183-187.
- Sponenberg DP, Carter ME, Carter GR, Cordes DO, Stevens SE, Veit HP. Suppurative epididymitis in a ram infected with *Actinobacillus seminis*. J Am Vet Med Ass 1983;182:990-991.
- Stephens LR, Humphrey JD, Little PB, Barnum DA. Morphological, Biochemical, Antigenic, and Cytochemical relationships among *Haemophilus somnus*, *Haemophilus agni*, *Haemophilus haemoglobinophilus*, *Histophilus ovis*, and *Actinobacillus seminis*. J Clin Microbiol 1983;17:728-737.
- Swanepoel ML. A study for differentiation of *Actinobacillus seminis*, *A. actinomycetem-comitans*, *Histophilus ovis* and *Pasteurella Haemolytica*. Onderstepoort J Vet Res 1984;51:41-46

- Tekes L, Hajtos I. Trials with an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the diagnosis of subclinical genital infections in rams caused by *Histophilus ovis* and *Actinobacillus seminis*. J Vet Med B 1990;37:549-555.
- Trejo GO, Zuñiga O, Alvarez MCI, Tórtora PJL. Epididimitis producida por bacilos pleomórfico Gram negativos. (Presumiblemente *Actinobacillus seminis*). Memorias del XII Congreso Nacional de Buiatría. Tampico, Tamaulipas. México. 21 al 23 de Agosto de 1986.
- van Soelingen D, de Haas PEW, Hermans PWM, van Embden JDA. Isolation of Genomic DNA from mycobacteria. National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, Holanda, 1991.
- van Tonder EM, Bolton TFW. The isolation of *Actinobacillus seminis* from bovine semen: a preliminary report. J S Afr Vet Ass 1970;41:287-288.
- van Tonder EM. Infection of rams with *Actinobacillus seminis*. J S Afr Vet Ass 1973;44:235-240
- van Tonder EM. *Actinobacillus seminis* infection in sheep in the Republic of South Africa I. Identification of the problem. Onderstepoort J vet Res 1979_a;46:129-133.
- van Tonder EM. *Actinobacillus seminis* infection in sheep in the Republic of South Africa III. Growth and cultural characteristics of *A. seminis*. Onderstepoort J Vet Res 1979_b;46:141-148.
- van Tonder EM. *Actinobacillus seminis* infection in sheep in the Republic of South Africa. II. Incidence and geographical distribution. Onderstepoort J vet Res 1979_c;46:135-140.
- van Tonder. *Actinobacillus seminis* infection in sheep in Shouth Africa. D.V.Sc. Thesis, University of Pretoria 1977.
- Walker RL, Leamaster BR, Stellflug JN, Biberstein EL. Association of age of ram with distribution of epididymal lesions and etiologic agent. J Am Vet Med Ass 1986;188:393-396.
- Walker RL, Leamaster BR. Prevalence of *Histophilus ovis* and *Actinobacillus seminis* in the tract of sheep. Am J Vet Res 1986;47: 1928-1930.
- Watt DA. Testicular pathology of Merino rams. Aust Vet J 1978;54:473-478.
- Watt DA, Bamford V, Nairn ME. *Actinobacillus seminis* as cause of polyarthritis and posthitis in sheep. Aust Vet J 1970;46: 515.
- Webb RF, Quinn CA, Cockram FA, Husband AJ. Evaluation of procedures for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. Aust Vet J 1980;56:172-175.
- Worthington RW, Cordes DO. The complement fixation test for *Brucella ovis*. N Z vet J 1981;29:63.
- Worthington RW, Stevenson BJ, de Lisle GW. Serology and semen culture for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in chronically infected rams. N Z vet J 1985;33:84-86.

ANEXO 1

PRUEBAS BIQUIMICAS

- TSI - Triple hierro azúcar agar (Bioxon Cat-114-1).

En este medio se determinó la capacidad de fermentar los azúcares glucosa, lactosa y sacarosa. Se sembró por picadura y estria. Se realizó la interpretación de los resultados según Mc Faddin (1990).

- SIM - Acido Sulfhídrico, Indol, Motilidad (Difco)

En este medio se determinó la capacidad de desdoblar el indol de la molécula de triptófano. Se sembró por picadura, cuando se observo crecimiento, se agregan 4 o 5 gotas de reactivo de Kovacs. La aparición de color rosa intenso se considera positivo.

- RM- Rojo de Metilo.(Merck- Cat 5712)

- OF-Oxidación-Fermentación (Bioxon-Cat 261)

Se realizó la prueba de OF con glucosa al 1%. El cambio de color de verde a amarillo se consideró positivo tanto, en el tubo de fermentación como en el de oxidación.

- Presencia de Ureasa (Bioxon Cat-214-1)

Se realizó sobre agar urea en pico de flauta y sembrado en estria. Se consideró positivo el cambio de color a rojo-rosado, cuando se observó crecimiento bacteriano en la estria.

- Oxidasa.

Se colocaron algunas gotas de solución de diclorohidrato de tetrametil-*p*-fenilhidramina al 1% en papel de filtro. La reacción positiva estuvo indicada por la aparición de coloración púrpura, a los 10 seg de ponerse en contacto con una asada del cultivo.

- Catalasa. Se colocó una gota de H₂O₂ 2% sobre una laminilla y se le puso en contacto con una asada cultivo. La aparición de burbujas se consideró positivo.

- Producción de sulfhídrico

La producción de H₂S se comprobó sobre agar tripticasa soya agar en pico de flauta sembrado en estria. Se detectó con tira impregnada en acetato de plomo al 10% la cual se colocó sostenida en la tapa del tubo, sin que tocan las paredes del mismo. Se consideró positivo con la aparición de un precipitado negro en la tira.

- Reducción de nitratos y nitritos. (Difco)

La siembra se realizó por picadura y en estria sobre agar nitratos y la interpretación según Mac Faddin (1990).

Identificación Bacteriológica

Pruebas bioquímicas realizadas para la identificación y diferenciación entre *A. seminis* y
B. ovis.

Pruebas	<i>A. seminis</i>	<i>B. ovis</i>
tinción Gram	bacilos pleomórficos Gram(-)	coco bacilos Gram (-)
TSI	Alc/Alc	Alc/Alc
SIM	-	-
Rojo de metilo	-	-
Ureasa	-	-
Catalasa	+	+
Oxidasa	-	-
Producción de ácido sulfhídrico	-	-
Reducción de nitratos y nitritos	-	+
Oxidación /fermentación de Glucosa	-	-
Prueba acriflavina	-	+

Alc= Alcalino

ANEXO 2

EXTRACCION DE ADN

La técnica de extracción se basó en la descrita por van Soolingen *et al.*,(1991)

Los cultivos puros, fueron cosechados en 1.5 ml de agua destilada estéril y esterilizados a 80°C por 20 min. Se almacenaron en congelación a -20°C hasta el momento de la extracción del ADN.

Se tomaron 400µl de la muestra, los que fueron tratados con 25µl de lisosima en una concentración de 20mg/ml por 1h a 37°C.

Posteriormente se le adicionaron 70µl de SDS 10% y 5µl de proteinasa K (10mg/ml en agua destilada), se mezcló y se incubó a 65°C durante 10 min.

Luego se agregaron 100µl de NaCl 5M y 100µl CETAB-NaCl previamente calentados a 65°C. Se mezcla y se incubó a 65°C 10 min.

En el siguiente paso se adicionaron 750µl una solución 24:1 de cloroformo /alcohol isomílico se agitó en agitador horizontal con los tubos eppendorf de lado durante 10 min y se centrifugó a 12,000 rpm, 15min a temperatura ambiente. En este momento se presentaron tres fases, se extrae la fase superior con cuidado de no arrastrar la intermedia.

La fase superior se coloca en un nuevo tubo eppendorf y se le agregaron 450µl de isopropanol (0.6 volúmenes) con la intención de precipitar el DNA; se agitó y se colocó en congelación -20°C durante 30 min. Se centrifugó a 12,000 rpm, 15 min a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante por decantación dejando una pastilla de aproximadamente 20µl.

A la pastilla se le agregó 1ml de etanol al 70% y se centrifugó a 12,000 rpm, 15min a temperatura ambiente. Se descartó el etanol y se dejó evaporar el tiempo necesario.

El ADN se resuspendió en el mínimo volumen posible de TE (25µl, 30µl, 50µl) y se guardó a -20°C hasta el momento de su uso.

PCR-ribotipo

El proceso del PCR se basó en el trabajo realizado por Appuhamy *et al.*, (1998)

Los iniciadores utilizados para realizar el PCR-ribotipo fueron G1RRN (GAAGTCGTACAAGG) y L1RRN (CAAGGCATCCACCGT), (Jansen *et al.* 1993; Appuhamy *et al.* 1998) suministrados por Gibco BRL, Inglaterra.

La reacción se realizó en un volumen total de 25 µl, que contenían 10 mM de amortiguador (Tris-HCl (pH 7.8) con 1.5 mM de MgCl₂ y 50 mM de KCl) (Perkin-Elmer, G1402, USA), 1,5 mM de MgCl₂, 0.02 mM de cada desoxirribonucleotido trifosfato (dNTP) (Gibco BRL, cod: 10297-08, Inglaterra), 100 pM de cada iniciador, 0.625 U de *Taq*-Polimerasa (Amplificasa, Biotecnologías Universitarias, UNAM, México) y 1 µl del ADN problema.

La amplificación se llevó a cabo en un Termociclador (Gene Amp PCR system 2400, Perkin-Elmer, USA). El tratamiento consistió en una desnaturalización primaria a 94°C por 5 min; para luego continuar con 35 ciclos de: 94°C-30 seg para desnaturalizar el ADN, 55°C-30 seg para el alineado y 72°C-30 seg para extender la reacción. Terminando con una extensión final a 72°C por 6 min.

A los productos de la amplificación se les realizó electroforesis horizontal sobre geles de agarosa, para lo cual se siguió el procedimiento que se describe a continuación:

- Se disolvió 2% de agarosa (Gibco BRL) en una solución de TBE 0.5 x y se calentó hasta ebullición. Cuando la solución estuvo a una temperatura aproximada de 40 C se le agregó bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y se vació en el molde en la cámara de electroforesis horizontal (Horizon 11-14, Life Technologies, Gibco BRL, USA). Una vez que gelificó se agregó a la cámara solución TBE 0.5 x hasta cubrir ligeramente el gel.
- Se mezclaron 5 µl de las muestras con 1 µl de solución de carga, las mezclas se colocaron en los pozos del gel (Erlich, 1989). Se colocó el marcador de tamaño molecular en uno de los pozos: 50 bp ladder (Sigma).
- Una vez concluida la electroforesis a 50-70 volts, el gel se observó sobre un transiluminador de luz ultravioleta (Foto/Prep1. Fotodyne).

Se tomaron fotos del gel con una cámara para fotografías instantáneas (Polaroid Mp4+. Fotodyne)

- Soluciones utilizadas en la Extracción de ADN

- Solución CTAB-NaCl.

10% CTAB

0.7 M NaCl

Calentar para disolver

- Solución TE 10:1

10 mM Tris-Cl pH 7.5 a 8.0

1mM EDTA pH 8.0.

- Soluciones utilizadas en el PCR

- TBE 5x

54 g Tris base

27.5 g ácido bórico

20 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)

cbp 1 L. Esterilizar en autoclave.

- Solución amortiguadora de carga para el corrimiento de la muestra en gel de agarosa

0.25% de azul de bromofenol

0.25% de xilencianol F. F

30% de glicerol en agua

Almacenar a 4°C.

ANEXO 3

1. SOLUCIONES

▪ Solución fijadora de Bouin

Solución saturada de ácido pícrico 1500 ml

Formol 40% 500 ml

Acido acético glacial 100 ml

La pieza se deja en el fijador 24 h y luego se realizan 3 cambios de a alcohol 70%.