



01674
24
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION
Y DE LA SALUD ANIMAL

EVALUACION DE LA TECNICA DE REACCION EN
CADENA DE LA POLIMERASA PARA EL
DIAGNOSTICO DE *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
ERIKA GABRIELA PALOMARES RESENDIZ

TUTOR: FRANCISCO SUAREZ GÜEMES
COMITE TUTORAL: EFREN DIAZ APARICIO
JOSE ANGEL GUTIERREZ PABELLO

CIUDAD UNIVERSITARIA,

I

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2003



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.

El presente estudio contó con el apoyo del Laboratorio de Bacteriología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP). CENID-Microbiología.

autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo respectivo.

NOMBRE: F. I. K. G. Leal

Rebollar Rosendo

FECHA: 29/03/08

SUMA: Rebollar Rosendo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Dedicatorias

A la memoria de mi padre: Juan Palomares, porque su amor y espíritu de superación siempre están conmigo.

A mi madre: Natalia Resendiz Baena, por apoyarme siempre en todo y por ser al mismo tiempo madre y padre en los momentos necesarios.

A mis hermanos: Rubén, Alejandra, Reina y Juan, por ser un estímulo constante en mi vida y por todo lo que representan en mi vida, gracias.

A Enrique, por todos estos momentos que hemos compartido juntos, por el apoyo brindado durante todo este tiempo, por todo lo que representas para mi y por tu amor, gracias.

A las Señoras: Leticia López Saldaña y Carmen Hernández León, por todo el apoyo que me han brindado, comparto hoy esta alegría con ustedes, gracias.

AGRADECIMIENTOS

A los Drs. Efrén Díaz Aparicio y Francisco Suárez Gúemes, por darme la oportunidad y el apoyo para poder realizar este trabajo

A la MC Laura Hernández Andrade, por su apoyo durante todo este tiempo

A los Drs. José Ángel Gutiérrez Pabello, Víctor Tenorio Gutiérrez y a la Dra. Mireya de la Garza Amaya, por el tiempo en la revisión de la tesis.

A todas aquellas personas que colaboraron en la realización de esta tesis.

RESUMEN

Erika Gabriela Palomares Resendiz. Evaluación de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de *Actinobacillus seminis* en ovinos. Asesorado por Dr. Francisco Suárez Güemes, Dr. Efrén Díaz Aparicio y Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello.

El objetivo del presente trabajo fue estandarizar la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y determinar sus alcances como método de diagnóstico para *Actinobacillus seminis* en muestras de semen, testículo y epidídimo de ovinos. Se utilizó el método de Fenol-CTAB para extraer el ADN de las muestras. La PCR se realizó con dos iniciadores SRJAS 1 Y SRJAS 2 que amplifican una banda de 436 pb diseñados a partir del interespacio 16S-23S ribosomal de *A. seminis*. La estandarización de la PCR se realizó a partir de una suspensión de *A. seminis*, en donde la cantidad de ADN mínima que se amplificó fue de hasta 2.8 pg. En las muestras de semen, testículo y epidídimo de los borregos desafiados experimentalmente, no se observó amplificación del fragmento a pesar de que en seis borregos se aisló *A. seminis* a partir de semen. En lo referente a la especificidad en los resultados obtenidos no se observó amplificación del fragmento, cuando se utilizaron diferentes bacterias relacionadas con *A. seminis*. En el estudio bacteriológico, realizado a las muestras de testículo y epidídimo de los animales desafiados experimentalmente, los resultados obtenidos fueron negativos, lo mismo sucedió con las muestras de semen de los animales de campo. Estos resultados indican que la sensibilidad de la PCR propuesta para el diagnóstico de aislados de *A. seminis* es adecuada. Sin embargo los resultados en muestras de semen y tejidos no fueron concluyentes.

Palabras Clave: Epididimitis, ovinos y PCR.

SUMMARY

Erika Gabriela Palomares Resendiz. Evaluation of the PCR technique for the diagnosis of *A. seminis* in sheep. Supervised by Dr. Francisco Suárez Güemes, Dr. Efrén Díaz Aparicio and Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello.

The objective of the present work was to standardize the polymerase chain reaction (PCR) and to determine the scopes as a diagnostic method for detection of *A. seminis* in semen, testicle and epididymis samples from sheep. The method CTAB detergent/phenol was used to extract the DNA of the samples. The PCR was carried out with a set of primers SRJAS1 and SRJAS2 that amplifies a 436 bp band designed starting from the 16S-23S spacer region of *A. seminis*. The standardization of PCR was carried out starting from a suspension of *A. seminis* where the quantity of minimum DNA that was amplified was of up to 2.8 pg. In the semen, testicle and epididymis samples of the sheep challenged experimentally amplification of the fragment was not observed, although in six sheep *A. seminis* was isolated from semen samples. Regarding the specificity of the test amplification of the fragment was not observed, when different bacteria related with *A. seminis* were used. In the bacteriological study carried out in testicle and epididymis samples results were negatives, the same thing happened with the semen samples of the field animals. These results indicate that the sensibility of PCR proposed for the diagnosis of isolated of *A. seminis* is the appropriate. However the results in semen and tissues samples were not conclusive.

Key words: Epididimitis, sheep and PCR diagnosis

ÍNDICE

Dedicatorias	III
Agradecimientos	IV
Resumen	V
Summary	VI
Introducción	1
Antecedentes	2
Signos clínicos	3
Necropsia	4
Epidemiología	5
Patogenia	6
Diagnóstico	9
Identificación de A. seminis	12
Utilización de la técnica de la PCR para el diagnóstico de A. seminis	12
Justificación	15
Hipótesis	15
Objetivo General	16

Objetivos Específicos	16
Material y Métodos	17
Bacteria de desafío.....	17
Inóculo de desafío.....	17
Desafío experimental.....	17
Toma de muestras.....	18
Animales de campo.....	19
Clasificación de las alteraciones testiculares.....	19
Estudio bacteriológico.....	20
Extracción de ADN a partir de muestras de tejido y de semen.....	20
Extracción de ADN de otros géneros bacterianos.....	22
Técnica de reacción en cadena de la polimerasa.....	23
Preparación del gel de agarosa.....	24
Resultados	
Examen clínico.....	26
Bacteriología de semen y órganos.....	27
Bacteriología de semen de los animales de campo.....	27
Resultados de los ensayos de la PCR realizados con ADN de la cepa de referencia de A. seminis.....	28
Resultados de los ensayos de la PCR en las muestras de testículo y semen de los animales inoculados.....	28
Resultados del PCR en las muestras de semen de los animales de campo.....	29
Discusión	30

Literatura citada.....	37
------------------------	----

Cuadros

Cuadro 1. Alteraciones al examen clínico de los borregos desafiados experimentalmente con <i>A. seminis</i>	43
---	----

Cuadro 2. Resultados del estudio bacteriológico a partir de semen de los borregos desafiados experimentalmente con <i>A. seminis</i>	44
--	----

Cuadro 3: Resultados del estudio bacteriológico a partir de órganos del aparato reproductor de los borregos desafiados experimentalmente con <i>A. seminis</i>	45
--	----

Cuadro 4. Bacterias aisladas de muestras de semen de borregos.....	46
--	----

Figuras

Figura 1. PCR realizado a partir de una suspensión de <i>Actinobacillus seminis</i>	47
---	----

Figura 2. Amplificación de PCR realizados con ADN extraído de diferentes especies bacterianas.....	48
--	----

Figura 3. Resultados de la PCR con diluciones de ADN de <i>A. seminis</i> , añadido a muestras de semen.	49
---	----

EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA EL DIAGNÓSTICO DE *Actinobacillus seminis* EN OVINOS

Introducción

La epididimitis ovina es una enfermedad infecciosa, contagiosa, progresiva e irreversible, de curso agudo o crónico, de presentación clínica o subclínica, caracterizada por la inflamación del epidídimo, que ocasiona en forma secundaria degeneración testicular, infertilidad y finalmente esterilidad del semental (Bagley, 1997). Es considerada una enfermedad económicamente importante, por sus efectos adversos sobre la fertilidad del rebaño del macho, los animales más valiosos del rebaño. (Walker *et al.*, 1986; Appuhamy *et al.*, 1998a), la disminución en el número de reemplazos disponibles, el uso de un mayor número de carneros por hembra y los gastos que ocasiona el mantenimiento de hembras no gestantes (Genetzky, 1995).

Esta patología ha sido asociada a *Brucella ovis* el agente causal más frecuente de epididimitis en ovinos. La epidemiología y patogénesis de esta enfermedad esta bien documentada, sin embargo gran variedad de organismos gram negativos pleomorficos también pueden ser responsables de la epididimitis ovina. Entre otros se han reportado: *Actinobacillus seminis*, *Actinobacillus actinomycentemcomitans*, *Archanebacterium pyogenes*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Manheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Brucella abortus*, *Histophilus ovis* y *Escherichia coli*. (Burgess, 1982; Walker *et al.*, 1986; Genetzky, 1995).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A pesar de la variedad de los agentes etiológicos involucrados en la epididimitis y de su diferente patogenia, éstos inducen lesiones en el epidídimo y testículo que no son diferenciales por palpación y cuadro clínico y tampoco por su patología.

Antecedentes

A. seminis causa epididimitis en ovinos con la consecuente infertilidad y finalmente esterilidad en los carneros; la presencia de este microorganismo se ha comprobado en diferentes países. *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 Inmunodifusión doble en gel (IDD) con la utilización de antígenos sonicados, comprobando la existencia de identidad antigénica con una cepa de referencia (ATCC 15768).

Signos clínicos

La epididimitis puede involucrar uno o ambos epidídimos del carnero. Cuando se afectan unilateralmente, la fertilidad disminuye y se puede sufrir una pérdida de más del 50% en la capacidad reproductiva, los carneros afectados bilateralmente son a menudo estériles (Walker *et al.*, 1986). La infección aguda usualmente desaparece después de 14 días, pero la muerte puede ocurrir principalmente en carneros jóvenes (Jansen, 1980_b). Las infecciones crónicas por *A. seminis* resultan en lesiones palpables en el epidídimo incluyendo cuerpo, cabeza y cola (Ley, 1993).

Como resultado de la infección se da una inflamación y estasis espermática, dando lugar a la formación de granulomas espermáticos que producen la obstrucción del epidídimo, estos granulomas pueden originar lesiones en testículo. (Sponenberg, 1983; Genetzky, 1995). En algunos casos de orquitis severa y epididimitis se presenta anorexia y depresión, lo que ocasionalmente provoca la muerte. En otros casos, la infección se presenta sólo en forma subclínica con la presencia de neutrófilos en el semen (Heath *et al.*, 1991).

Los signos clínicos son similares en infecciones naturales y experimentales. En una infección aguda el testículo afectado está engrosado, edematoso, caliente y blando, los signos asociados incluyen fiebre, cojera y segregación del hato.

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 observan adheridas pudiendo estar comprendidas la túnica y la piel (Bagley, 1997; Ley,

1993). En algunos casos se produce la ruptura escrotal y la formación de fistulas que drenan el material purulento (Genetzky, 1995). Las vesículas seminales pueden presentarse aumentadas de tamaño, con una lobulación exageradamente aumentada. 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).

El sitio de lesión más frecuente en casos de epididimitis en carneros maduros es la cola del epidídimo (86.4%). En borregos de alrededor de un año de edad, las lesiones se presentan con mayor frecuencia 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).

Necropsia

Cuando se realiza la necropsia o la castración de carneros afectados en la forma aguda, el escroto y la túnica vaginal se muestran marcadamente congestivos y edematosos a la incisión. La túnica vaginal aparece adherida 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).

Los animales con epididimitis presentan anomalías espermáticas en el rango de un 10 a 45 % contra un 3 a 9 % en los sanos, la motilidad progresiva varía entre un 30 a un 80% contra un 82 a 94% en los animales

sanos, además el semen contiene gran cantidad de neutrófilos y células epiteliales en los animales afectados (Low *et al.*, 1995; Mbai *et al.*, 1996) En estudios bacteriológicos realizados por Walker *et al.*, 1986, en carneros adultos y vírgenes de Estados Unidos de Norte América, 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* se aisló en todos los carneros vírgenes afectados.

Epidemiología

A. seminis es considerada como causante de infertilidad en carneros del Reino Unido. Fue aislada en tres de 16 carneros con lesiones genitales y pobre calidad de semen, con edades de ocho meses a dos años y medio. Así mismo fue aislada en dos 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 ocho meses y seis años (Low *et al.*, 1995).

A. seminis fue aislada 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 portadores asintomáticos (Van Tonder, 1979_a).

En muchas ocasiones se logran aislamientos bacterianos de las vesículas seminales y de las ámpulas del deferente con apariencia normal (Jansen, 1980_b). El semen de carneros infectados contiene leucocitos, espermatozoides muertos, detritos celulares y espermatozoides con cabeza y

cuerpo separados, algunos carneros con epididimitis subclínica no muestran títulos serológicos o lesiones clínicas pero eliminan al organismo en el semen. *A. seminis* puede ser observado en frotis de semen después de teñirlo con violeta de genciana (Jansen, 1980_a).

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 $260 \times 10^6/\text{ml}$ contra $1850 \times 10^6/\text{ml}$ (Low *et al.*, 1995; Mbai *et al.*, 1996).

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 % en la prueba de IDD con antígeno soluble de *A. seminis* (Méndez *et al.*, 1999).

Patogenia

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.

Walker y Leamaster, (1986) comprobaron la presencia de *A. seminis* e *H. ovis* en la mucosa del pene y vagina en animales jóvenes alrededor de los seis meses, siendo los aislamientos más frecuentes que en borregos mayores de dos años. Los aislamientos de estas bacterias comienzan a partir de las 12 semanas de vida, alcanzando su máximo a las 20 semanas, para luego caer al año de edad. Jansen, (1980_a) estudió el papel del estado hormonal en la migración de los microorganismos de las partes superficiales del aparato reproductor (mucosa peneana) a las profundas (epidídimo y testículo), con base en los cambios que se producen a nivel del aparato reproductor durante el despertar de la pubertad, especialmente en las células del epitelio epididimal. Únicamente logró aislar *A. seminis* de la próstata, vesículas seminales y ampulla 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 hormona luteinizante. 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), reprodujeron 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 de la bacteria en semen, pero fallando al tratar de establecer de un modo natural la transmisión de la enfermedad.

Lozano, (1986) inoculó *A. seminis* proveniente 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, así por ejemplo en cinco de seis animales con lesiones de epididimitis se aisló *A. seminis* combinado con *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.* y *Actinomyces pyogenes* (Mbai *et al.*, 1996). Los mecanismos de patogenicidad de *A. seminis*, se encuentran poco estudiados y sólo existen trabajos sobre adhesión y la presencia de toxinas (Healey *et al.*, 1991).

Con relación a la adhesión esta se realiza a las células epiteliales y es esencial para la virulencia de algunas bacterias, para establecer la infección se requiere una asociación entre las adhesinas de superficie y receptores celulares, esto es el paso inicial en la patogénesis de muchas enfermedades, Healey *et al.*, (1991) demostraron la adhesión de *A. seminis* a células renales y la inhibición de éstas con anticuerpos monoclonales específicos, por lo tanto sugieren que es posible que *A. seminis* se adhiera al epidídimo por adhesinas de superficie, que se asocian a los receptores específicos de las células epiteliales del hospedero causando epididimitis en carneros vírgenes, también sugieren que dentro de la especie pueden existir animales que carecen de estos receptores, como se ha demostrado en cerdos en relación a la adhesina K88 de *Escherichia coli*.

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* que es una especie relacionada 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 de los cuadros clínicos desarrollados por la bacteria (Korostoff *et al.*, 1998).

Diagnóstico

El diagnóstico se establece con base 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 rebaño se debe considerar principalmente, la edad de los carneros, el número de carneros por hembra, convivencia de carneros adultos con jóvenes, el estado higiénico de los corrales, la entrada de nuevos sementales y hembras de reemplazo, 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 reproductor, es recomendable que el carnero sea sujetado en posición de "sentado". Se debe realizar una correcta observación del escroto, poniendo atención en su simetría y a la posible 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 epidídimo 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 y son difíciles de palpar en animales normales, el ser reconocidos con facilidad, 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 posibles adherencias y realizar la palpación del cordón espermático. Por último extraer el pene y comprobar la integridad de su mucosa. (Otrowski, 1962). Se debe extraer semen, preferentemente por electroeyaculación, 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; Mbai *et al.*, 1996). Es importante comprobar si existen de células inflamatorias, en frotis directo de semen teñidos con Giemsa, también realizar tinción de gram para verificar la posible 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 microaerofilicas 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, esta tinción, 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 *et al.*, 1989). Van Tonder, (1979_b) concluye que en el diagnóstico individual y de hato se debe hacer una evaluación completa incluyendo examen clínico, de semen, bacteriológico y serológico.

Identificación de *Actinobacillus seminis*

A. seminis esta clasificada en la familia *Pasteurellaceae*, este organismo es gram negativo, no móvil, no presenta esporas, pleomórfico y en forma de cocos o coco bacilos de $1\ \mu\text{m} \times 4.5\ \mu\text{m}$, ordenados individualmente, en pares o pequeñas cadenas, son anaerobios facultativos su temperatura óptima de crecimiento es 37°C con una atmósfera de 10% de CO_2 , para su cultivo *in vitro* se requiere de medios enriquecidos con sangre o suero del 5 al 10%. Luego de 24 horas se observan las colonias del tamaño de una cabeza de alfiler, a las 48 horas alcanzan un diámetro de 1 a 2 mm, poseen color gris blanquecino, convexas, redondeadas con márgenes enteros, a los cuatro días adquieren un diámetro mayor de 3 mm (Burgess, 1982; Sneath y Stevens, 1990). Las características bioquímicas que permiten identificar a *A. seminis* son: catalasa, oxidasa y nitratos positivos, indol y urea negativos y presentan pobre fermentación de glucosa (Low *et al.*, 1995). En estudios de microscopía electrónica no se observan esporas, cápsula o pili en las cepas evaluadas (Spondenberg *et al.*, 1983).

El empleo de técnicas bacteriológicas y la eliminación de los animales infectados del hato disminuye la incidencia de la enfermedad, sin embargo hay ocasiones en que las pruebas diagnósticas no concuerdan entre sí (Beeman *et al.*, 1982).

Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa

Recientemente se han sugerido métodos moleculares rápidos, como la identificación de ácidos nucleicos de una región blanco, específica del genoma



bacteriano por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que es ampliamente utilizada para la detección y diagnóstico de patógenos.

Varios investigadores han experimentado con la técnica de PCR enfocada al diagnóstico de brucelosis, utilizando una fracción del gen *omp2* de *Brucella*, para amplificar fragmentos de diferentes tamaños que pueden diferenciar entre especies de *Brucella* (Ficht *et al.*, 1996; Arellano, 1998).

La capacidad para amplificar ADN específico por PCR de un número reducido de bacterias, así como la sencillez, la rapidez y la reproducibilidad de la técnica ofrecen ventajas sobre los cultivos convencionales y métodos fenotípicos para la identificación. El método de PCR ha sido utilizado para detectar una variedad de agentes microbiológicos en muestras clínicas, aunque existen problemas que pueden resultar del bajo número de microorganismos en una muestra y el efecto inhibitorio de ciertos componentes biológicos (Appiahmy, 1998_b).

La técnica de PCR detecta y multiplica una secuencia específica de ADN de la bacteria de la cual se sospecha y se puede realizar a partir de muestras de tejido y muestras clínicas como sangre, leche, orina, saliva y otros fluidos (Leal *et al.*, 1995). Esta técnica es un método *in vitro* para la síntesis enzimática de secuencias específicas de ADN. En general el procedimiento depende de la disponibilidad de las secuencias que flanquean las regiones de interés, estas secuencias son complementarias a un segmento de ADN molde de cada una de las cadenas. El ADN es desnaturalizado a altas temperaturas, es decir la doble cadena se abre para que posteriormente se unan los iniciadores a una temperatura de 55°C y por último la extensión del ADN a partir del extremo 3' de los iniciadores que se lleva a cabo a una temperatura de 72°C. El producto final es entonces desnaturalizado para empezar otro

ciclo, la eficiencia de esta amplificación permite el uso de pequeñas cantidades de ADN blanco. Estas temperaturas se repiten con un total de 30 ciclos o más según las características del ADN blanco, como la cantidad de G+C en el fragmento a amplificar (Bell, 1989).

La técnica de PCR se ha utilizado para realizar una rápida identificación de *A. seminis* y establecer diferencias con otros géneros bacterianos. Una región del genoma bacteriano que parece proporcionar un adecuado blanco para la identificación de la bacteria es la región espaciadora entre los genes 16S y 23S rARN. La amplificación del PCR de la región espaciadora 16S-23S rARN ha sido sugerida como base de la identificación universal de la bacteria. Appuhamy *et al.*, 1998, en un estudio, muestran que el PCR ribotipo de la región espaciadora 16S-23S rARN genera dos amplificaciones comunes en todas las muestras de donde aislaron *A. seminis*, posteriormente utilizaron las secuencias de esas dos regiones espaciadoras intergénicas y elaboraron iniciadores especie-específicos para la rápida detección e identificación de *A. seminis* por PCR. Para este PCR específico se diseñaron iniciadores que amplifican una región del gene *rrnB* que es uno de los dos operones ribosomales caracterizados, que codifica para dos ARN de transferencia (tARN-Ile y tARN-Ala). Se utilizaron muestras de semen de carneros, de las cuales ya se había aislado e identificado *A. seminis*, con estas muestras obtuvieron un solo producto de 436 bp y no obtuvieron amplificación con otras bacterias del tracto reproductor ovino.

Justificación

México cuenta con una población ovina promedio de seis millones de borregos y el 55 % de la población esta concentrada en los estados de: México, Hidalgo, Puebla, Tlaxcala, Querétaro, Michoacán, Zacatecas, Morelos y Guanajuato (Arteaga, 1999). Por la presión de la elevada demanda, la importación de ganado en nuestro país a superado el 50% del abasto nacional, lo que favorece el riesgo de que se presente la introducción de enfermedades por desvío de los animales de abasto hacia fines de cría, lo que permitiría la diseminación de enfermedades infecciosas como es el caso de la epididimitis introducida por animales descartados en otros países por presentar la enfermedad.

Comúnmente no se realiza el diagnóstico etiológico de las epididimitis en carneros. Para poder determinar que es ocasionada por *A. seminis* se debe utilizar el estudio bacteriológico, pero por las características propias del organismo, este proceso es difícil y tardado. En este trabajo se evalúa la técnica de PCR para diagnosticar la presencia de *A. seminis* y eventualmente poder contar con una técnica más sensible y rápida que la bacteriología.

Hipótesis

La técnica del PCR permite la identificación de ovinos infectados por *A. seminis*, a partir de muestras de tejido y de semen, de forma más eficiente que la bacteriología.

Objetivo General

Estandarizar la técnica de PCR y determinar sus alcances como método de diagnóstico para *Actinobacillus seminis* en muestras de semen, testículos y epidídimo de ovinos.

Objetivos Específicos

- ◆ Determinar la sensibilidad de la técnica de PCR, conociendo la cantidad mínima de ADN de *Actinobacillus seminis*, que amplifica.
- ◆ Conocer la especificidad de la técnica de PCR con otros géneros bacterianos que están implicados en la presencia de epididimitis ovina.
- ◆ Comparar las técnicas de bacteriología y PCR, para el diagnóstico de *Actinobacillus seminis* en semen y tejidos de borregos desafiados con la cepa de referencia ATCC 15768 de *A. seminis*.
- ◆ Utilizar la técnica de PCR con muestras de semen provenientes de rebaños donde existan borregos con epididimitis.

Material y métodos

Bacteria de desafío

Se utilizó la cepa de *A. seminis* ATCC 15768 (Healey *et al.*, 1985; Cárdenas 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.

Inóculo de desafío

Los inóculos se prepararon a partir de cultivos sobre agar sangre de *A. seminis* que se cosechó a las 48 h en solución salina fisiológica (SSF). La concentración del inóculo fue de 1.6×10^8 ufc/ml y se comprobó la cantidad de unidades formadoras de colonias (ufc) por el método descrito por Miles *et al.*, (1938).

Desafío experimental

Se emplearon un total de 18 borregos clínicamente sanos, de seis meses a un año de edad, provenientes de un hato libre de la enfermedad.

Once animales fueron inoculados con dos mililitros por vía intrauretral.

Tres borregos se inocularon con un mililitro directamente al epidídimo izquierdo.

Cuatro animales fueron testigos negativos y a dos de éstos se les dio un tratamiento traumático irritativo mediante inyección de etilenglicol en epidídimo.

Post-inoculación, los borregos se mantuvieron aislados en corrales individuales, para evitar la posible transmisión entre ellos.

Toma de muestras

Cada semana se realizó el examen clínico del aparato genital de los borregos, describiendo las posibles lesiones y su ubicación. Y se colectaron muestras de semen para realizar el estudio bacteriológico y la extracción de ADN. La extracción del semen se realizó con electroeyaculador, lavando previamente el prepucio con agua estéril con 1% de cloruro de benzalconio y secando con algodón estéril.

La electroeyaculación se realizó siguiendo la técnica descrita por Hafez, (1993). Se sujeto al animal en decúbito lateral, se extrajo el pene y se mantuvo exteriorizado sosteniéndolo con una gasa colocada por detrás del glande, se introdujo en el recto un palo de madera con dos electrodos, lubricado con vaselina y se realizaron movimientos de masaje ejerciendo presión sobre el piso de la pelvis. Se aplicaron pulsos de 10 segundos aumentando el voltaje entre pulso y pulso dejándose un tiempo de descanso de 10 segundos. El semen se recolectó en bolsas estériles que se guardaron a 4°C para su inmediato traslado al laboratorio, donde fueron conservadas a -80°C.

Treinta días después del desafío los carneros fueron sacrificados humanitariamente y se colectaron asépticamente los testículos y epidídimos

(cola y cabeza), se colocaron en bolsas de plástico estéril y se guardaron a 4°C para su inmediato traslado al laboratorio, donde fueron conservadas a -80°C.

Animales de campo

Se obtuvieron 50 muestras de sangre y semen de animales con y sin epididimitis clínica. El examen clínico a los sementales se realizó por observación y palpación de los testículos considerando la simetría testicular, el deslizamiento de los testículos en la bolsa escrotal, para determinar la presencia de adherencias de las tunicas vaginales, así como establecer la consistencia y el tamaño del epidídimo (cabeza, cuerpo y cola).

Clasificación de las alteraciones

Epidídimo (cola, cuerpo y cabeza)

Una cruz: Representaron pequeñas variaciones en tamaño, con aumento en la consistencia del órgano o la presencia de irregularidades en la superficie.

Dos cruces: Aumento de tamaño de entre el 50% y el 100%.

Tres cruces: Entre el 100% y el 300% de aumento de tamaño.

Cuatro cruces: Aumento de tamaño mayor del 300%.

Testículos.

Dos cruces: Representaron un aumento del tamaño de hasta 25 %.

Tres cruces: Aumento de tamaño entre el 25% y el 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 una gran alteración en el epidídimo del otro lado.

Estudio bacteriológico

Las muestras de tejido fueron flameadas con alcohol y se colocaron en bolsas de plástico estéril, a las que se les agregó SSF estéril, para triturarlas en una maceradora de tejidos¹. Con un hisopo estéril se obtuvo una muestra con la cual se inocularon dos placas de agar sangre, que se incubaron a 37°C en una atmósfera de 10% de CO₂, revisándolas diariamente para determinar el desarrollo bacteriano. (Heath, 1991).

Las muestras de semen fueron inoculadas mediante un hisopo en agar sangre, se incubaron a 37°C en una atmósfera de 10% de CO₂ por tres días y las colonias sospechosas fueron identificadas mediante su morfología, frotis y coloración de gram y por pruebas bioquímicas: catalasa, oxidasa, nitratos, indol, urea y presencia de fermentación de glucosa (Low *et al.*, 1995).

El resto del tejido macerado y del semen se guardaron a -80°C para la posterior extracción de ADN.

Extracción de ADN a partir de muestras de tejidos y de semen

Preparación de las muestras: Del tejido previamente macerado se tomaron dos ml, (con las muestras de semen se trabajo con un mililitro), se colocaron

¹ Stomacher LAB Blender

en un tubo de polipropileno² de 50 ml; se inactivaron a 90°C, por 15 minutos, en baño María.

Técnica de extracción (Ausubel *et al.*, 1995; con modificaciones).

A los tejidos se les agregó un volumen de solución de Tripsina-Versene. Se agregaron 5 volúmenes de solución de lisis y se añadieron 60µl de lisozima (20 mg/ml) (concentración final de 0.8 mg/ml). Se incubó 1 hora a 37°C, se agregaron 625 µl de SDS al 10%, (concentración final de 0.5%), se añadió 50 µl de proteinasa K (20 mg/ml), (concentración final de 0.1 mg/ml); incubando 1 hora a 37°C en baño María. Se agregó 1.75 ml de NaCl 5M (concentración final de 0.7M). Se adicionó 1.4 ml de CTAB-NaCl, (concentración final del 1%); mezclándose e incubándose a 65°C, 10 minutos. Se agregó 1 volumen de Cloroformo-álcohol isoamílico 24:1, se mezcló 10 minutos y se centrifugó por 5 minutos a 3500 x g. Se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo, resistente al fenol, sin tomar la interfase.

Se añadió un volumen de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico 25:24:1 (Fenol equilibrado con Tris-HCl, pH 8.0). Se mezcló 10 minutos y se centrifugó durante 5 min/ 3500 x g. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se agregaron 0.6 volúmenes de isopropanol. Se mezcló suavemente hasta que el ADN precipitó (aproximadamente 15 minutos). Se centrifugó 15 minutos a 10000 rpm, y posteriormente se desechó el sobrenadante cuidando de no eliminar la pastilla y se agregó 1 ml de etanol al 70 %. Se cambió a un microtubo nuevo y estéril. Se microcentrifugó³ 5 minutos a 20000 x g y se

modelo 400 (BA 7021)

² Falcon.

³ Microcentrifuga Jouan A-14.

eliminó el sobrenadante. Se dejó secar, se resuspendió en solución amortiguadora TE. Se agregaron de 200 a 1000 μ l de solución, según el tamaño de la pastilla de ADN.

ADN de *A. seminis* disuelto en ADN de semen negativo

Se realizó una dilución 1:50 del ADN de *A. seminis* con ADN de semen negativo, posteriormente se realizaron 10 diluciones decimales para determinar la sensibilidad de la PCR utilizando la mezcla de ambos ADNs, los cuales fueron obtenidos por separado.

Extracción de ADN de muestras frescas de semen con *A. seminis*

Para determinar la sensibilidad de la PCR, en muestras frescas de semen, se realizaron diez diluciones decuples de *A. seminis*. De cada dilución se tomaron 1000 μ l y fueron añadidos a 1000 μ l de semen libre de *A. seminis* a esta mezcla se le realizó la extracción de ADN por el método fenol-CTAB. Con el ADN obtenido se llevo a cabo la PCR bajo las mismas condiciones.

Extracción de ADN de otros géneros bacterianos

Se realizó la extracción de ADN de cultivos puros de *Brucella ovis*; *Pasteurella multocida*; *Manheimia haemolytica*, *Escherichia coli*, *Histophilus ovis*, *Brucella melitensis*, *Proteus vulgaris*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella boydii*, *Salmonella typhi* y *Haemophilus somnus* que se utilizaron para

comprobar si amplifican el segmento estudiado en la PCR, por estar relacionadas con *A. seminis* o por estar involucradas en casos de epididimitis.

Técnica de la reacción en cadena de la polimerasa

Las técnica de PCR descrita se basa en la utilización de iniciadores del interespacio 16S-23S ribosomal que forman parte de *A. seminis*, éste incluye una reacción de PCR con un juego de dos iniciadores, desarrollados por el Dr. Appuhamy, de la Universidad de Glasgow, estos permiten la amplificación de un fragmento de 436 pares de bases (Appuhamy *et al.*, 1998₆).

La premezcla para la reacción de PCR se realizó en una campana de seguridad clase II, en un sitio diferente de donde se realizaron las extracciones para evitar la contaminación con ADN extraño a la muestra.

Las muestras de ADN de las diluciones de *A. seminis* y de los tejidos de borregos obtenidas de la extracción antes descrita, se trabajaron con este protocolo de PCR.

Se realizó en un volumen final de 25 μ l con los siguientes reactivos:

Solución amortiguadora de PCR 2,5 μ l (100 mM Tris-HCl, 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl, pH 8.3)

2 μ l (0.2 μ M) de cada dNTP⁴

1 μ l (50 pM) de cada iniciador

.125 μ l (0.625 U) de Taq polimerasa⁵

2.5 μ l de ADN

⁴ Boheringer mannheim.

Se preparó una premezcla, incrementando la concentración de reactivos de acuerdo al número de muestras que se trabajaron. La premezcla contenía solución amortiguadora, dNTPs, iniciadores y Taq polimerasa; posteriormente se agregó a un microtubo de 500 µl la cantidad necesaria para cada muestra, más agua mill Q estéril cbp 25 µl. El ADN se agregó al final.

El programa del termociclador⁶ fue el siguiente:

Una desnaturalización inicial a 94° C por 5 min , seguido de 35 ciclos a 94° C por 30 s, 55° C por 30 s, 72 °C por 30 s; y una extensión final a 72° C por 6 minutos.

Secuencia de los iniciadores de esta reacción:

³AAGAAAAAGACGAAGAGACATT⁵

³CTTATCTTTCTTAAGCCCTGAC⁵

Preparación del gel de agarosa

Se disolvió 1% de agarosa⁷ en una solución de TBE 0.5X 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

⁵ Biotecnologías Universitarias, UNAM, México.

⁶ Gene-Amp PCR system. 2400. Perkin Elmer

⁷ GIBCO BRL

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

cámara de electroforesis horizontal⁸. Una vez que gelificó, se agregó a la cámara solución TBE 0.5X hasta cubrir ligeramente el gel.

Se mezclaron 5 μ l del producto de PCR con 1 μ l de solución de carga y se colocaron en el pozo (Erich, 1989). Una vez concluida la electroforesis a 50-70 volts, por una hora, se observó el gel sobre un transiluminador de luz ultravioleta⁹. Se tomaron fotos del gel con una cámara para fotografías instantáneas¹⁰.

⁸ Horizon 58, Life Technologies, Gibco BRL

⁹ Foto/ Prep1, Fotodyne

¹⁰ Polaroid Mp4+, Fotodyne

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Resultados

Examen clínico

De los animales que recibieron inoculación intrauretral, el 63.6% presentaron alteraciones en testículos y epidídimos (Cuadro 1).

En los borregos que recibieron inoculación directa en la cola del epidídimo izquierdo, se observó aumento de tamaño en las colas de los epidídimos de todos los borregos, a esto se sumó la dificultad en el desplazamiento de los epidídimos y testículos en la bolsa escrotal. En dos de estos animales 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.

En el grupo control, los dos animales que recibieron tratamiento traumático, presentaron lesiones apreciables a partir de la primera semana y se calificaron con una cruz, en los animales restantes no se detectaron alteraciones en el epidídimo.

Bacteriología de semen y órganos

Los hallazgos bacteriológicos en el semen y órganos se describen en los Cuadros 2 y 3. El aislamiento bacteriológico de los órganos del aparato reproductor de los animales que recibieron inoculación intrauretral fue negativo, sin embargo en cuatro animales se logró el aislamiento de *A. seminis* a partir de muestras de semen las dos primeras semanas post-inoculación.

En dos de los tres borregos que fueron inoculados directamente en el epidídimo, se logró el aislamiento de *A. seminis* a partir de muestras de semen y en un animal a partir de la cola del epidídimo izquierdo.

En el grupo control los borregos resultaron negativos al aislamiento de *A. seminis*, sin embargo se aislaron bacilos gram negativos en los borregos que recibieron el tratamiento traumático.

Bacteriología de semen de animales de campo

El semen de los 50 borregos fue examinado por bacteriología. No se logró ningún aislamiento de *A. seminis*, sin embargo otras bacterias como *Brucella ovis*, *Corynebacterium*, *Hamophilus somnus*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* fueron aisladas del semen de 20 animales con y sin lesiones clínicas palpables. De 19 muestras se aislaron pequeños bacilos pleomorficos gram negativos que mostraron pocas diferencias al compararlos con la cepa de referencia de *A. seminis* (Cuadro 4).

Resultados de los ensayos de la PCR realizados con ADN de la cepa de referencia de *A. seminis*.

La estandarización de la amplificación del ADN de la prueba de PCR se realizó a partir de una suspensión de *A. seminis*, amplificando el fragmento 436 pb como lo muestra la Figura 1.

Al realizar el ensayo de la PCR con las muestras de ADN de semen negativo inoculadas con las diluciones de ADN de *A. seminis*, se observó amplificación del fragmento esperado en todas las diluciones como se ilustra en la Figura 2.

En los resultados obtenidos en la PCR, con el ADN obtenido a partir de los cultivos puros de *Brucella ovis*; *Pasteurella multocida*; *Manhemia haemolytica*, *Escherichia coli*, *Histophilus ovis*, *Brucella melitensis*, *Haemophilus somnus*, *Proteus vulgaris*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella bordi* y *Salmonella typhi*. No se observó amplificación del fragmento 436 pb Figura 3.

Resultados de la PCR en muestras de testículo y semen de los animales inoculados.

En los ensayos de PCR, realizados en las muestras de órganos y de semen de los animales inoculados, no se observó amplificación del fragmento de ADN de *A. seminis*, a pesar de que en seis animales se obtuvieron resultados bacteriológicos positivos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Resultados de la PCR en muestras de semen fresco y *A seminis*.

Al determinar la sensibilidad de la PCR con muestras frescas de semen, se obtuvo la amplificación del fragmento hasta la dilución 10^{-2} , resultando en una concentración final de *A seminis* de 162.5 ufc/ml

Resultados de la PCR en muestras de semen de los animales de campo.

En ninguna de las 50 muestras de semen de los animales de campo con y sin cuadro clínico de epididimitis, no se logró la amplificación del fragmento de 436 pb de *A seminis*, a pesar de que en 19 de ellas se aislaron bacilos pleomorficos gram negativos que habian mostrado similitudes con *A seminis* cuando se compararon con la cepa de referencia.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

La epididimitis infecciosa causada por *A. seminis* en los carneros es considerada una enfermedad económicamente importante, por sus efectos adversos sobre la fertilidad en el rebaño ovino (Walker *et al.*, 1986; Appuhamy *et al.*, 1998_a). El aislamiento de *A. seminis* es de suma importancia en el diagnóstico de la epididimitis, sin embargo esto no siempre es posible, prueba de ello es que en esta investigación las muestras de los borregos desafiados intrauretralmente con *A. seminis* presentaron aislamiento negativo pese a desarrollar cuadro clínico. Por otra parte no se logró aislar la bacteria de los órganos del aparato reproductor de los animales sacrificados a pesar de que más del 80% presentó algún tipo de lesión en el testículo y epidídimo, sin embargo se logró en seis animales, aislamientos de *A. seminis* del semen las dos primeras semanas post-inoculación y en dos de éstos las últimas dos semanas post-inoculación, a pesar de que no presentaron polimorfonucleares (PMN). 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 semen (Van Tonder, 1979; Low *et al.*, 1995). Lo anterior sugiere que la bacteria logró colonizar el aparato genital en cantidad suficiente para mantenerse en él, ser eliminada por semen y aislarse para luego desaparecer o reducir su cantidad a niveles que imposibilitaron su aislamiento.

Se obtuvieron dos aislamientos a partir de semen, procedentes de los borregos que recibieron *A. seminis* directo al epidídimo, sólo en un animal de este grupo se logró aislar la bacteria de la cola del epidídimo izquierdo, sin embargo todos presentaron lesiones similares en el lugar de la inoculación semejantes a las reportadas previamente para este procedimiento, 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*.

En un ensayo de reproducción de la enfermedad por inoculación intraepididimal, realizada por Baynes y Simmons, (1960), en cuatro borregos lograron aislar la bacteria del punto de inoculación de dos de ellos, en otro del conducto deferente y en un animal no lograron aislamientos al momento del sacrificio a los 60 días. Los cambios clínicos en los animales desafiados en este trabajo son también coincidentes con los que estos autores señalan. Ellos encontraron a la semana agrandamiento de la cola del epidídimo inoculado, 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 el otro la atrofia se hizo palpable a los 20 días.

En otro estudio realizado por Livingston y Hardy, (1964) en dos animales inoculados por vía intraepididimal, logran aislar la bacteria a los 27 días en uno de ellos, a pesar de encontrar cambios patológicos en ambos. En este estudio se logró aislar la bacteria en cuatro de 11 animales desafiados intrauretralmente, en las primeras dos semanas después del desafío a pesar de encontrar cambios patológicos en siete animales. En tres animales desafiados directamente en la cola del epidídimo se logró aislar la bacteria en dos de ellos a pesar de los cambios patológicos presentados en todos los animales. Livingston y Hardy no realizaron estudios en 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 epidídimos resultaron negativos a la bacteriología. En este estudio tampoco se trabajó con glándulas anexas a pesar de que en dos animales que no presentaron alteraciones testiculares, de uno se aisló *A. seminis* la primera semana post-inoculación y otro en la segunda y la quinta semana post-inoculación. esto puede refrendar

las observaciones de algunos autores sobre la presencia del patógeno en las glándulas anexas las cuales podrían actuar como reservorios de la bacteria en su pasaje hacia el epidídimo (Baynes y Simmons, 1960; Simmons *et al.*, 1966; Jansen, 1980; Heath *et al.*, 1991).

En el grupo control de esta investigación, no se logró aislar la bacteria, las lesiones en la cola del epidídimo izquierdo donde se realizó el tratamiento traumático resultaron negativas a la bacteriología. Las lesiones producidas se caracterizaron por grados leves de hiperplasia del epitelio epididimal a formaciones granulomatosas de tipo 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, pero la ausencia de PMN en la lesión, es sugestivo de que las bacterias no se establecieron en el mismo.

Existen diferentes protocolos de extracción de ADN, así el protocolo de extracción con el detergente CTAB y fenol ha sido utilizada con buenos resultados en la extracción de ADN de *Brucella spp.* para la técnica de PCR (Romero *et al.*, 1995). El fenol es un solvente orgánico que se equilibra a un pH de 8.0 el cual permite extraer las proteínas, lípidos y otro tipo de detritus celulares que contienen las células. El ADN por ser un ácido, con pH inferior al del fenol queda separado y disuelto en la fase acuosa.

El CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) es un detergente aniónico que libera el ADN, además, retira los polisacáridos y otras macromoléculas; y permanece en la fase fenólica. Arellano, (1998), evaluó diferentes protocolos de extracción y el ADN obtenido por este método fue el que propició una mayor sensibilidad en la PCR trabajando con ADN de suspensiones celulares de

Brucella melitensis, logrando amplificar hasta 15×10^1 UFC/ml. En el caso del presente trabajo, este método fue el que se utilizó alcanzando una sensibilidad de hasta 2.8 nanogramos, de ADN siendo constante la amplificación en todas las diluciones.

Cuando se añadió ADN de *A. seminis* al ADN de semen, no hubo ningún tipo de inhibición. Appuhamy *et al.*, 1998, obtuvo los mismos resultados cuando *A. seminis* fue añadido a semen fresco de ovinos, la detección límite fue de 3-6 ufc por muestras, similar a la obtenida con *A. seminis* diluida en agua destilada.

Se utilizaron diversas bacterias que sirvieron para determinar la especificidad, los resultados al realizar la PCR fueron negativos. Es necesario señalar que en una muestra de semen y/o testículo proveniente de ovinos, sería poco probable encontrar algunas de estas bacterias, aun cuando *E. coli* y *Salmonella spp* afecta a un gran rango de hospederos (Díaz *et al.*, 1987).

No existen datos de la utilización de la técnica de PCR para detectar a *A. seminis* a partir de testículos de ovinos, tampoco se ha hecho una comparación de la sensibilidad del PCR con la sensibilidad de la bacteriología. En el presente trabajo, con los datos obtenidos de los ensayos a partir de suspensiones de *A. seminis* se observó que la PCR utilizada mostró una alta sensibilidad. Sin embargo, cuando se aplicó la metodología descrita al ADN de muestras de semen y tejidos a partir de los animales inoculados, no se obtuvo la sensibilidad esperada, resultando negativos al PCR. Se pensó entonces en la posibilidad de que la cantidad de ADN era excesiva, ya que así se observó en los geles y no permitía desarrollar en forma adecuada la técnica, sin embargo al realizar diluciones de cada una de las muestras siguieron negativas al PCR.

En seis animales el aislamiento bacteriológico fue positivo de muestras de semen, sin embargo al realizar la PCR resultaron negativos, esto podría deberse a la solución de almacenamiento que se ocupó para conservar las muestras. Appuhamy *et al.*, 1998_b, realizaron experimentos con muestras de semen con solución de almacenamiento que contenía tris, glucosa, ácido cítrico, yema de huevo, glicerol, penicilina y estreptomycin en agua destilada, y encontraron que la solución de almacenamiento inhibe la reacción de la PCR ya que la detección limite fue de 320 ufc/ml. También utilizaron semen de seis borregos infectados con *A. seminis* de los cuales se había aislado e identificado a esta bacteria por pruebas bioquímicas y las muestras que contenían gran cantidad de bacterias, más de 10^6 ufc/ml, fueron positivas a la PCR, sin embargo muestras que contenían pocas bacterias, 150 ufc/ml, resultaron negativas. Con base en estas investigaciones se recomendó trabajar con muestras de semen fresco, sin adicionar solución de almacenamiento, para un mejor diagnóstico de *A. seminis* por la PCR. En este trabajo cuando se emplearon muestras de semen fresco de animales negativos y se añadió *A. seminis*, el limite de detección fue de 162.5 ufc/ml, no se obtuvo la sensibilidad esperada como cuando se trabajó con ADN de *A. seminis* y ADN de semen y esto pudo deberse a la presencia de componentes en el semen que inhiben la amplificación de la PCR (Amin *et al.*, 2001). Sin embargo con esta metodología se obtuvo una mayor sensibilidad de la prueba que la obtenida por Appuhamy *et al.*, 1998_b, ya estos investigadores necesitaban hasta 10^6 ufc/ml para obtener una reacción positiva.

Las muestras de animales de campo se trabajaron en menos de 24 horas para obtener mejores resultados. A pesar de esto, todas las muestras de semen resultaron negativas a bacteriología y PCR, logrando aislar otras bacterias como *Brucella ovis*, *Corynebacterium spp*, *Harmophilus somnus*,

Staphylococcus spp., *Streptococcus spp.* del tracto reproductor de 20 animales con y sin lesiones clínicas. Por otra parte de 19 muestras se aislaron pequeños bacilos pleomorficos gram negativos que mostraron similitudes con la cepa de referencia de *A. seminis*. Jansen, (1983), encontró 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. Se aisló *P. haemolytica*, *H. ovis*, *C. pseudotuberculosis*, *Corynebacterium xerosis*, *Micrococcus varians*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus spp* y *Acinetobacter*, de las ámpulas del deferente; *P. haemolytica*, *C. pseudotuberculosis*, *M. luteus*, *Staphylococcus spp.*, *Acinetobacter*, de las vesículas seminales; *P. haemolytica* y *C. Pseudotuberculosis*; de las colas del epidídimo; *P. haemolytica*, *C. pseudotuberculosis*, *Corynebacterium paurometabolicum*, *M. luteus*, *Acinetobacter* y *Arthrobacter flavescens* de las cabezas del epidídimo. En este trabajo no se realizó la discriminación de género entre *Actinobacillus* y *Pasteurella*, se observaron diferencias entre carneros criados en forma intensiva y extensiva, encontrando bacterias en algún sector del aparato reproductivo en los 12 carneros provenientes de explotaciones intensivas, mientras que en los provenientes de explotaciones extensivas, siete presentaron distintas bacterias en el tracto y cinco resultaron negativos (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*, algunas de las cuales también fueron aisladas en este trabajo.

La técnica de PCR evaluada y practicada a los tejidos de ovinos, no obtuvo resultados tan satisfactorios como cuando se usó en las suspensiones bacterianas, sin embargo no se puede afirmar que no sea útil en el diagnóstico de la epididimitis ovina. Así como se ha tenido éxito con la técnica de PCR

para el diagnóstico de otras enfermedades que afectan a los animales (Rodríguez, 1997), es posible que la metodología aquí propuesta pueda modificarse en cuanto a las concentraciones de reactivos utilizados y programa en el termociclador para hacerlo útil como prueba diagnóstica y que además presente una sensibilidad y especificidad aceptable. En este trabajo no se pudo demostrar una mayor sensibilidad de la técnica de PCR comparada con la bacteriología, ya que en ningún caso se obtuvieron resultados positivos. Se propone seguir investigando al respecto, ya que esta técnica es una buena herramienta diagnóstica que se puede implementar en un laboratorio; además tiene la ventaja de poder inactivar las muestras desde un principio, evitando que puedan llegar a infectar a la persona que trabaja en el laboratorio y es posible obtener un resultado en dos o tres días, lo cual no sucede con la bacteriología, ya que un resultado confirmatorio puede tardar hasta 7 días.

Algunos de los inconvenientes de esta técnica son la facilidad con la que se pueden contaminar las muestras con ADN externo, que aunado a su alta sensibilidad, puede resultar en falsos positivos. Es necesario que la persona que trabaje esta técnica sea altamente capacitada y minuciosa. El laboratorio donde se implemente la técnica debe contar con el equipo especializado como lo es el termociclador y centrifugas donde se puedan trabajar con volúmenes muy pequeños (microlitros).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

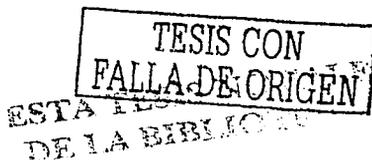
Literatura citada

- Amin Adel, Mahmoud ER, Adel K. Detection of *Brucella melitensis* in semen using the polymerase chain reaction assay. *Veterinary Microbiology* 2001; 83:37-44.
- Appuhamy S, Coote JG, Low JC, Parton R. PCR methods for identification and characterization of *Actinobacillus seminis* stains. *J Clin Microbiol* 1998; 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; 85:941-948.
- Arellano Reynoso Beatriz. Comparación de las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa y bacteriología para el diagnóstico de *Brucella melitensis* en caprinos vacunados e infectados. (Tesis de Maestría) México. D. F. México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. 1998.
- Arteaga. La Ovinocultura en México. 1999
- Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, Moore D D, Seidman J G, Smith J A, Struhl K. Short Protocols in Molecular Biology. 3rd edition. U. S. A: Wiley. pp 2.11- 2.12, 1995.
- Bagley CV. Epididymitis in range and purebred rams. *J Am Vet Med Ass* 1997;18: 798-801.
- Baynes ID, Simmons GC. Ovine epididymitis caused by *Actinobacillus seminis*. *Aust Vet J* 1960;36:454-459.
- Baynes ID, Simmons GC. Clinical and pathological studies of Border Leicester rams naturally infected with *Actinobacillus seminis*. *Aust Vet J* 1968;44:339-343.
- Beeman KB, Hummels S, Rahaley R. Epididymitis in rams. *Agri Practice (Veterinary medicine/ Small animal clinican)* 1982:november; 1647-1650.

- Bell John. The polymerase chain reaction. *Immunology Today* 1989; 10:351-355.
- Bulgin MS, Bruss ML, Anderson BC. Methods for control of lamb epididymitis in large purebred flocks. *J Am Vet Med Ass* 1990;196:1110-1115.
- Burgess GW. Ovine contagious epididymitis: a review. *Vet Microbiol* 1982; 7:551-575.
- 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.
- De la Puente-Redondo VA, García BN, Pérez MC, González RMC, Rodríguez FEF, Gutiérrez MCB. Isolation of *Actinobacillus seminis* from the genital tract of rams in Spain. *J Comp Pathol* 2000;122:217-222.
- Díaz A E, Jaramillo M L, Aguilar R F, Cárdenas L S. Aislamiento e identificación de Salmonelas en caprinos de México. *Técnica Pecuaria en México* 1987; 25: 49- 51
- Ekdahl MO, Money DFL, Martin CA. Some aspects of epididymitis of rams in New Zealand. *N Z vet J* 1968; 16:81-82.
- Erlich HA, editor. PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification. Ed Stockton press. USA. 1989. pag 8-16.
- Ficht T A, Hussein H S, Derr J, Bearden S W. Species -specific sequences at the omp2 Locus of *Brucella* Type strains. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1996; 46:1, 329-331.
- Genetzky RM. Epididymitis in Rams. *The Compendium Food Animal* 1995;17:447-454.
- Hafez ESE. Reproduction in farm animals. 6ed. Ed. Lea & Febiger. USA. 1993. pag 177, 402-404.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- 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, 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.
- 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.
- Heath PJ, Davies JH, Morgan, Aitken IA. Isolation of *Actinobacillus seminis* from rams in the United Kingdom. Vet Rec 1991; 129:304-307.
- Jansen BC. The aetiology of rams epididymitis. Onderstepoort J vet Res 1980a; 47:101-107.
- Jansen BC. The pathology of bacterial infection of the genitalia in rams. Onderstepoort J vet Res 1980b; 47:263-267.
- Jansen BC. A surgical technique for the experimental reproduction of epididymitis in rams. Onderstepoort J vet Res 1980c; 47:281-283.
- Jansen BC. The epidemiology of bacterial infection of the genitalia in rams. Onderstepoort J Vet Res 1983; 50:275-282.
- 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.



- Leal K D S, Martínez V I O, López M A, Martínez S J P. Single-Step PCR for detection of *Brucella* spp from blood and milk of infected animals. *J. of Clinical Microbiology* 1995; 33:12. 3087-3090.
- 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 isotates from rams with palpable epididymitis. *Am J Vet Res* 1986; 47: 1153-1156.
- 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.
- 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.
- 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.
- Otrowski, JEB. "Diagnóstico de fertilidad en el carnero" en *Miscelánea N°4*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria Centro Regional Patológico. Treleu-Chubut, Argentina. 1962.
- Rodríguez J M. Detection of animal pathogens by using the Polymerase Chain Reaction (PCR). *The Veterinary Journal* 1997; 153: 3. 287- 305.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Romero C, Gamazo C, Pardo M, López Gofí I. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. *J. of Clinical Microbiology* 1995; 33: 3. 615-617.
- 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.
- Schaller A, Kuhnert P, de la Puente-Redondo VA, Nicolet J, Frey J. Apx toxins in *Pasteurellaceae* species from animals. *Vet Microbiol* 2000; 74:365-376.
- Simmons GC, Baynes BV, Ludford B. Epidemiology of *Actinobacillus seminis* in a flock of Border Leicester sheep. *Aust Vet J* 1966;42:183-187.
- Sneath PHA and Stevens M. *Actinobacillus rossii* sp. nov., *Actinobacillus seminis* sp. nov., *Pasteurella lymphangitidis* sp. nov., *Pasteurella mairi* sp. nov., and *Pasteurella trehalosi* sp. nov. *International Journal of systematic bacteriology*. Apr.1990. p. 148-153.
- 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.
- 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.
- Trejo GO, Zuñiga O, Alvarez MCI, Tórtora PJL. Epididimitis producida por bacilos pleomórfico Gram negativos. (Presumiblemente *Actinobacillus seminis*). *Memorias del XII Congreso Nacional de Buiatria*. Tampico, Tamaulipas. México. 21 al 23 de Agosto de 1986.
- Van Tonder EM. Infection of rams with *Actinobacillus seminis*. *J S Afr Vet Ass* 1973;44:235-240

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Van Tonder. *Actinobacillus seminis* infection in sheep in Shouth Africa. D.V.Sc. Thesis, University of Pretoria 1977.
- Van Tonder EM. *Actinobacillus seminis* infection in sheep in the Republic of South Africa I. Identification of the problem. Onderstepoot 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*. Onderstepoot 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. Onderstepoot J vet Res 1979c; 46:135-140.
- Walker RL, Leamaster BR. Prevalence of *Histophilus ovis* and *Actinobacillus seminis* in the tract of sheep. Am J Vet Res 1986; 47: 1928-1930.
- 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.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 1. Alteraciones al examen clínico de los borregos desafiados experimentalmente con *A. seminis*

Tratamiento	Número	Localización de las lesiones y alteraciones en el examen clínico			
		CEI	CaEI	TI	SA
Inoculación intrauretral con <i>A. seminis</i>	833	+	+		
	859	++		+++	
	877	++	++		
	905				SA
	843	+	+		
	856	+			
	883	+			
	884	+			
	932				SA
	935				SA
	941				SA
	Inoculación directa en la cola del epidídimo izquierdo con <i>A. seminis</i>	930	++++		++
934		+++		++	
938		+++		+++	
Grupo control	840				SA
	906				SA
	896	+			
	897	+			

CEI Cola epidídimo izquierdo

TI testículo izquierdo

CaEI Cabeza epidídimo izquierdo

S.A. Sin alteración

Grado de lesión de + a ++++

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 2. Resultados del estudio bacteriológico a partir de semen de los borregos desafiados experimentalmente con *A. seminis*.

Tratamiento	Número	Aislamiento de <i>A. seminis</i> semanas				
		1a	2a	3a	4a	5a
Inoculación intrauretral con <i>A. seminis</i>	833	s				
	859		As			
	877		As			
	905					
	843					
	856					
	883					
	884					
	932		s			
	935	As				
	941	s	As	s	s	As
Inoculación directa en la cola del epidídimo izquierdo con <i>A. seminis</i>	930	s	As		As	As
	934		s			
	938	As	s	s		s
Grupo control	840					
	906					
	896	BG +				
	897	BG +				

As *Actinobacillus seminis*

s Sospechosa por ser bacilo pleomórfico

BG +Bacilos Gram Positivos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 3. Resultados del estudio bacteriológico a partir de órganos del aparato reproductor de los borregos desafiados experimentalmente con *A. seminis*.

Tratamiento	Número	Aislamiento de <i>A. seminis</i>					
		Test Izq.	Cab Izq.	Cola Izq.	Test Der.	Cab Der.	Cola Der.
Inoculación intrauretral con <i>A. seminis</i>	833	-	-	BG+	-	-	-
	859	CG+	-	-	CG+	-	-
	877	-	-	-	-	BG+	BG+
	905	-	-	-	-	-	-
	843	-	-	-	-	-	-
	856	-	-	-	-	-	-
	883	-	-	-	-	-	BG+
	884	-	-	-	-	CG+	-
	932	-	-	BG-	-	-	-
	935	-	-	-	-	-	-
	941	-	-	-	-	-	-
Inoculación directa en la cola del epididimo izquierdo con <i>A. seminis</i>	930	CG+	CG+	As	-	-	-
	934	-	-	CG+	-	-	-
	938	-	-	-	-	-	-
Grupo control	840	-	-	-	-	-	-
	906	-	-	-	-	-	-
	896	-	-	-	-	-	-
	897	-	-	-	-	-	-

CG+ Cocos Gram Positivos s Sospechosa por ser bacilo pleomórfico

BG- Bacilos Gram Negativos - Aislamiento negativo

BG+ Bacilos Gram Positivos As *Actinobacillus seminis*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 4. Bacterias aisladas de muestras de semen de borregos

Número	Lesiones clínicas	Descripción de la lesión	Bacteria aislada en semen	
1862	Presentes	ACol y Cal++	<i>Brucella ovis</i>	
1813		ACaD+	<i>Brucella ovis</i>	
280		Postitis	<i>Brucella ovis</i>	
1750		ACol+	<i>Corynebacterium spp.</i>	
129H		ACal+	<i>Haemophilus somnus</i>	
01		ACaD++	<i>Staphylococcus spp.</i>	
5006		ACaD+	<i>Staphylococcus spp.</i>	
B1		ACaD+	<i>Staphylococcus spp.</i>	
02		ACaD+	<i>Streptococcus spp.</i>	
1813		ACaD+	<i>Streptococcus spp.</i>	
129H		ACal+	<i>Streptococcus spp.</i>	
1473		Ausentes	S A	<i>Brucella ovis</i>
1427			S A	<i>Brucella ovis</i>
1883			S A	<i>Corynebacterium spp.</i>
1898	S A		<i>Corynebacterium spp.</i>	
1875	S A		<i>Corynebacterium spp.</i>	
1811	S A		<i>Corynebacterium spp.</i>	
1876	S A		<i>Corynebacterium spp.</i>	
5050	S A		<i>Streptococcus spp.</i>	
990	S A	<i>Streptococcus spp.</i>		

ACol = Alteración en cola izquierda

ACal = Alteración cabeza izquierda

ACaD = Alteración cabeza derecha

ATI = Alteración testículo izquierdo

Grado de lesión de + a ++++

S A = Sin alteración

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

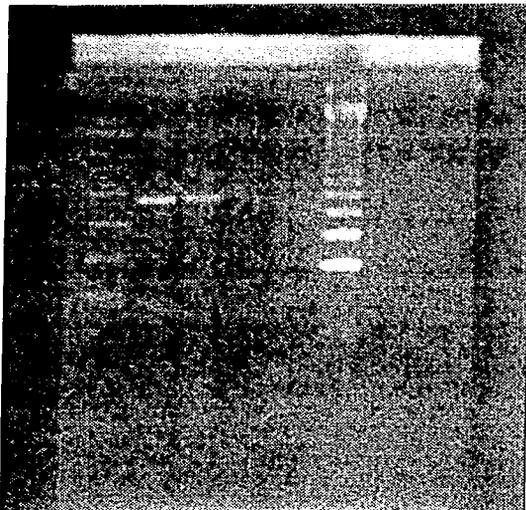


Figura 1. PCR realizado a partir de una concentracion de *Actinobacillus seminis*

Carril 1 - Marcador de peso molecular 50-2000 bp

Carril 2 - Control positivo de *A. seminis*

Carril 3 - Control positivo de *A. seminis*

Carril 4 - Control negativo

Carril 5 - Control negativo

Carril 6 - Marcador de peso molecular 123 bp

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Figura 2. Resultados de la PCR con diluciones de ADN de *A. seminis*. añadido a muestras de ADN de semen

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

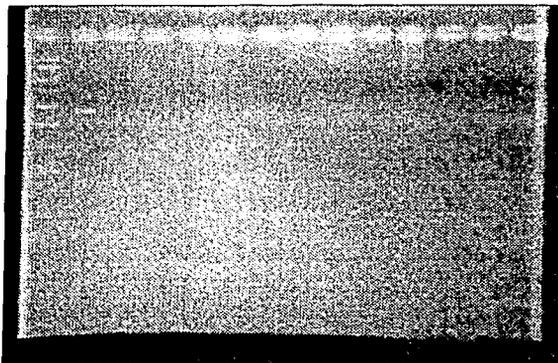


Figura 3. Amplificación de la PCR realizada con ADN extraído de diferentes especies bacterianas

- Carril 1 - Marcador de peso molecular 2000 BP
- Carril 2 - *Actinobacillus seminis*
- Carril 3 - *Brucella melitensis*
- Carril 4 - *Proteus vulgaris*
- Carril 5 - *Yersinia enterocolitica* 5/8
- Carril 6 - *Pasteurella multocida*
- Carril 7 - *Shigella boydii*
- Carril 8 - *Yersinia enterocolitica* 0/9
- Carril 9 - *Salmonella typhi*
- Carril 10 - *Manhaemia haemolitica*
- Carril 11 - *Escherichia coli*
- Carril 12 - *Brucella ovis*
- Carril 13 - *Haemophilus somnus*
- Carril 14 - Agua

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN