



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

HISTOPATOLOGÍA, CÉLULAS DE RESPUESTA INMUNE Y AUTOINMUNIDAD
EN EL APARATO REPRODUCTOR DE CARNEROS CON EPIDIDIMITIS
CLÍNICA CAUSADA POR *Brucella ovis*

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
JOSÉ LUIS GUTIÉRREZ HERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL:
Dr. JORGE LUIS TÓRTORA PÉREZ
FES CUAUTILÁN - UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
Dr. EFRÉN DÍAZ APARICIO
FES CUAUTILÁN - UNAM
Dr. VÍCTOR RUBÉN TENORIO GUTIÉRREZ
FES CUAUTILÁN - UNAM

MÉXICO, D.F. ABRIL 2013



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.

Este trabajo fue financiado por el programa PACIVE - 2012 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán - UNAM a través de la cátedra "Patología y enfermedades de los rumiantes".

*A la memoria de Isabel García y Dollar,
quienes me dieron todo su cariño y llenaron
mi vida de alegría y bendiciones.*

*A mis padres y hermana, que han sido
incondicionales en mi desarrollo profesional.*

Agradecimientos

A los integrantes del comité tutor: Dr. Jorge Tórtora Pérez, Dr. Efrén Díaz Aparicio y Dr. Víctor Tenorio Gutiérrez por el apoyo y orientación brindada durante mis estudios de posgrado.

A los miembros del jurado: Dr. Francisco Suárez Güemes, Dr. Jorge Tórtora Pérez, Dr. Jorge Acosta Dibarrat, Dr. Efrén Díaz Aparicio y Dr. Víctor Tenorio Gutiérrez por los valiosos comentarios durante la revisión de esta tesis.

A los laboratorios de la FES Cuautitlán – UNAM, el laboratorio de bacteriología del CENID Microbiología Animal – INIFAP y a los laboratorios del CIESA – UAEM donde se desarrollaron las pruebas para la realización de este trabajo.

Al personal, compañeros y amigos de los laboratorios de la FES Cuautitlán – UNAM por todo el apoyo brindado, en especial al M en C. Germán Garrido Fariña, por la enseñanza y preparación de los cortes histológicos.

Al personal, compañeros y amigos del CENID Microbiología Animal – INIFAP, especialmente a la Dra. Gabriela Palomares Reséndiz, M en C. Lucía Favila Humara y a la Biol. Isabel Tuxpan Galván, quienes me instruyeron en las técnicas de laboratorio para el diagnóstico de las enfermedades de los rumiantes.

Al personal del CIESA - UAEM, particularmente al Dr. Jorge Acosta Dibarrat por las facilidades otorgadas durante mi estancia.

RESUMEN

La epididimitis infecciosa en carneros es considerada una enfermedad importante por sus efectos negativos sobre la fertilidad del rebaño, se asocia frecuentemente a infecciones por *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* e *Histophilus somni*. El objetivo del trabajo fue describir la patología, la respuesta inmune y autoinmune en ovinos naturalmente infectados por *B. ovis*. Se colectaron 552 muestras de suero y 114 muestras de semen de carneros para determinar mediante inmunodifusión doble en gel (IDGA), anticuerpos contra *B. ovis*, *A. seminis* e *H. somni* y mediante reacción en cadena de la polimerasa múltiple (PCR múltiple) la presencia de éstas bacterias en semen de carneros seropositivos a *B. ovis*. Empleando ELISA indirecto se evaluó la presencia de anticuerpos IgA e IgG antiespermatozoides en el suero de carneros sanos y seropositivos a *B. ovis*. Se caracterizaron las lesiones histopatológicas y la presencia de células de respuesta inmune en tejidos del tracto reproductor de carneros seropositivos a *B. ovis*. Se observó una frecuencia de positividad a *B. ovis* de 16.3% (90/552), la PCR múltiple demostró la presencia de *B. ovis* en el semen de nueve de catorce muestras de carneros seropositivos, una de ellas también positiva a *A. seminis*. Los niveles de anticuerpos IgA e IgG contra espermatozoides en carneros seropositivos fueron más elevados que en los carneros sanos ($p < 0.05$). Las lesiones propias de la enfermedad se encontraron principalmente en testículos y epidídimos, caracterizándose por infiltrado leucocitario y de células plasmáticas con presencia de granulomas. La presencia de células de respuesta inmune en zonas lesionadas del tracto reproductor de carneros con epididimitis clínica causada por *B. ovis*, permite la exposición de células espermáticas a estos tipos celulares y los mecanismos inmunes y autoinmunes determinan una condición irreversible en el cuadro clínico de la enfermedad que evoluciona hacia la esterilidad.

**HISTOPATOLOGY, IMMUNE RESPONSE CELLS AND AUTOIMMUNITY
IN THE REPRODUCTIVE TRACT OF RAMS WITH CLINICAL
EPIDIDYMITIS CAUSED BY *Brucella ovis***

ABSTRACT

Ovine epididymitis is considered an important disease by the negative effects on herd fertility; this is often associated with infections by *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* and *Histophilus somni*. The aim of this study was to describe the pathology, immune and autoimmune responses in rams naturally infected with *B. ovis*. A total of 552 ram sera samples were tested for *B. ovis*, *A. seminis* and *H. somni* infection by Agar gel immunodiffusion. Semen samples from 114 rams were collected for the diagnosis of the three microorganisms' infection by PCR múltiplex. Levels of IgA and IgG antisperm antibodies were measured by indirect ELISA in serum of *B. ovis* seropositive rams. Histopathological lesions and the presence of immune response cells were characterized on reproductive tract tissues from *B. ovis* seropositive rams. The seropositivity rate to *B. ovis* was 16.3% (90/552); the PCR múltiplex test in semen samples of *B. ovis* seropositive rams showed the presence of this bacterium in nine of fourteen samples, also one positive to *A. seminis*. The levels of IgA and IgG antisperm antibodies from naturally infected rams was higher than from healthy rams ($p < 0.05$). Characteristic lesions of the disease were mostly found in testis and epididymis; characterized by leukocyte infiltration, plasmatic cells and granulomas. The immune response cells from injured areas of the reproductive tract of rams with clinical epididymitis caused by *B. ovis*, allows exposure of sperm cells to immune system, followed by autoimmune mechanisms that determine an irreversible condition in the clinical picture of the disease progressing to sterility.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Epidemiología y distribución geográfica de la enfermedad	2
1.2 Transmisión	3
1.3 Patogenia	5
1.4 Participación del sistema inmune en la enfermedad	6
1.4.1 Autoinmunidad a causa de <i>B. ovis</i> en el aparato reproductor del carnero	8
1.5 Diagnóstico de epididimitis causada por <i>B. ovis</i>	10
1.5.1 Diagnóstico clínico	10
1.5.2 Diagnóstico bacteriológico	11
1.5.3 Diagnóstico serológico	11
1.5.4 Diagnóstico molecular	12
1.6 Prevención y control	13
2. JUSTIFICACIÓN	15
3. HIPÓTESIS	15
4. OBJETIVO GENERAL	16
5. OBJETIVOS PARTICULARES	16
6. MATERIAL Y MÉTODOS	17
6.1 Obtención de las muestras	17
6.2 Lugar donde se realizaron las pruebas	17
6.3 Diagnóstico serológico de la epididimitis ovina	18
6.3.1 Antígenos para las pruebas de IDGA	18
6.3.2 IDGA para la detección de anticuerpos contra <i>B. ovis</i> , <i>A. seminis</i> e <i>H. somni</i>	19
6.4 Detección de <i>B. ovis</i> , <i>A. seminis</i> e <i>H. somni</i> en semen mediante PCR múltiple	20
6.5 Detección de anticuerpos antiespermatozoides en suero sanguíneo	21
6.5.1 Antígeno para la detección de anticuerpos antiespermatozoides	21
6.5.2 ELISA indirecto para la detección de anticuerpos antiespermatozoides	22
6.5.3 Determinación de proteínas antigénicas de los espermatozoides ovinos	23

6.6 Obtención de muestras de tejido y examen histopatológico.....	24
6.7 Análisis estadístico	25
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
7.1 Diagnóstico serológico de epididimitis ovina	26
7.2 Detección de <i>B. ovis</i> , <i>A. seminis</i> e <i>H. somni</i> mediante PCR múltiple.....	28
7.3 Autoinmunidad contra células espermáticas y determinación de proteínas antigénicas de los espermatozoides ovinos	29
7.3 Descripción de lesiones histopatológicas en carneros con epididimitis clínica causada por <i>B. ovis</i> y células de respuesta inmune observadas	33
8. CONCLUSIONES	35
9. LITERATURA CITADA.....	36

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Preparación de geles para IDGA	19
Cuadro 2. Especificaciones de los iniciadores utilizados para la PCR múltiple	21
Cuadro 3. Concentraciones utilizadas para la PCR múltiple.....	21
Cuadro 4. Condiciones para llevar a cabo la PCR múltiple.....	21
Cuadro 5. Concentraciones de los sueros y conjugados para el ELISA	23
Cuadro 6. Resultados serológicos positivos contra <i>B. ovis</i> , <i>A. seminis</i> e <i>H. somni</i> obtenidos mediante IDGA	26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Productos obtenidos en PCR múltiple a partir de ADN bacteriano en semen.....	28
Figura 2. Comparación de medias de densidades ópticas por cada grupo e isotipo de inmunoglobulina.....	30
Figura 3. Infiltrados celulares observados en epidídimos de carneros con epididimitis	33

1. INTRODUCCIÓN

La infertilidad en los ovinos está asociada a múltiples factores: nutricionales, de manejo reproductivo, genéticos e infecciosos, los cuales comprometen la eficiencia reproductiva y productiva del rebaño. Dentro de las causas infecciosas asociadas a la infertilidad se encuentra la infección por *Brucella ovis* (*B. ovis*), las consecuencias principales de la enfermedad se observan en los carneros con disminución de la fertilidad hasta que ocurre la esterilidad a causa de la epididimitis y la degeneración testicular inducidas por la bacteria, en ovejas ocurren abortos en baja proporción y un ligero aumento de la mortalidad perinatal (Kováčová *et al.*, 2007; Manazza *et al.*, 2006).

La epididimitis contagiosa del carnero ha sido definida como una enfermedad transmisible producida por *B. ovis*, la inflamación del epidídimo es la principal lesión clínico-patológica (Burgess, 1982), sin embargo también se han descrito cuadros de epididimitis con aislamiento de bacterias diferentes a *B. ovis*, pero que no parecen tener comportamiento epidémico, de estas bacterias de la microbiota permanente o transitoria del tracto reproductor de los carneros *Actinobacillus seminis* (*A. seminis*) e *Histophilus somni* (*H. somni*) han sido de las más estudiadas y se sugiere que causan infecciones ascendentes a las glándulas sexuales accesorias y al epidídimo y en ocasiones al testículo (Acosta *et al.*, 2006 y 2007; Scalman, 1992). Otras bacterias como *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Pasteurella multocida*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* y *Escherichia coli* también han sido descritas como agentes causales de dicha afección (Hernández *et al.*, 2006; Manazza *et al.*, 2006; Robles, 1998; Buckrell *et al.*, 1985; DeLong *et al.*, 1979; Cox *et al.*, 1977).

Debido a que esta enfermedad presenta como principal signo las anomalías en la cola del epidídimo, su presencia solo se hace evidente al momento de la venta, o cuando se realiza movilización de los carneros y los animales son sometidos al examen clínico del aparato reproductor y a otras pruebas diagnósticas, sin embargo, la detección de

alteraciones en el epidídimo no siempre son demostrables mediante el examen clínico (Hernández *et al.*, 2006).

1.1 Epidemiología y distribución geográfica de la enfermedad

La epididimitis infecciosa del carnero causada por *B. ovis* se ha descrito en varios países: Australia, Brasil, Canadá, Chile, Francia, Alemania, Hungría, México, Nueva Zelanda, Perú, Rumanía, Rusia, República Eslovaca, África del Sur, España, Estados Unidos de América, Argentina y Uruguay (Hernández *et al.*, 2006; Manazza *et al.*, 2006; Núñez *et al.*, 1997), en general, la presencia de esta enfermedad se ha descrito en países donde la cría y explotación de los ovinos es económicamente significativa (Burgess, 1982).

B. ovis fue aislada por primera vez en Nueva Zelanda por McFarlane y col. en 1952 a partir de ovejas que abortaron. En 1956 la epididimitis en carneros es reportada simultáneamente por Simmons y Hall en Australia y por Buddle y Boyes en Nueva Zelanda. En 1956 también fue reportada por primera vez en América por Kennedy y col. y en 1961 en Argentina, en donde Szyfres y Chappel lograron el aislamiento de *B. ovis* del semen de un carnero con epididimitis (Robles, 1998a).

En 1974 Suárez *et al.*, reportaron la presencia en México de anticuerpos contra *B. ovis* mediante un estudio serológico realizado en borregos pelibuey, y en 1979 se realizó el aislamiento de la bacteria a partir de casos clínicos en carneros procedentes de los Estados Unidos (Pérez *et al.*, 1979). Anteriormente se estimaba la prevalencia de la epididimitis por *B. ovis* en los rebaños entre el 9.1 y el 46.7% en Nueva Gales del sur, Australia (Sergeant, 1994). Blasco, 1990b, menciona que cuando la enfermedad es reportada por primera vez en un país o región, su incidencia oscila entre el 20% y 60% de los carneros infectados y entre el 40% y el 70% de los rebaños infectados, siendo la raza, edad, sexo, región y manejo del rebaño los factores determinantes de la incidencia de la enfermedad. Actualmente se estima que la prevalencia de la enfermedad se encuentra

entre el 5% y el 100% de los carneros del rebaño, pero habitualmente se encuentra entre el 10% y el 40% (Acosta y Tórtora, 2005), dichas prevalencias dependerán en gran medida del manejo productivo, sanitario y reproductivo de cada rebaño. En 1999 se reportó una seroprevalencia contra *B. ovis* del 9% en carneros del Altiplano de México diagnosticados previamente con la enfermedad, pertenecientes a seis explotaciones ovinas dedicadas a engorda, pie de cría y docencia (Méndez *et al.*, 1999).

1.2 Transmisión

La infección natural por *B. ovis* ocurre solamente en el ovino y en el venado cola roja, y no constituye una zoonosis (Ficapal *et al.*, 1998). La difusión de la enfermedad entre carneros infectados y no infectados, como resultado del contacto directo entre ellos fue demostrada por Buddle en 1955 (Robles, 1998). *B. ovis* causa infecciones clínicas o subclínicas caracterizadas por la inflamación del epidídimo, orquitis e infertilidad (Ficapal *et al.*, 1998). Los carneros sexualmente maduros son más susceptibles a la enfermedad (Walker *et al.*, 1986), sin embargo se ha demostrado la infección en ovinos de hasta 4 meses de edad (Burgess, 1982).

La infección por *B. ovis* en hembras no presenta signos evidentes, se ha reportado que la placentitis y los abortos son escasos (menos del 10%), afectando únicamente a ovejas primerizas (Kováčová *et al.*, 2007; Ficapal *et al.*, 1998), aumentando el porcentaje de mortalidad perinatal en el rebaño (Acosta *et al.*, 2002), se ha sugerido que la vía congénita sería una ruta factible de infección con *B. ovis* (Burgues, 1982). Se ha reportado también que las hembras pueden jugar un papel importante en la transmisión de *B. ovis* cuando éstas son previamente montadas por un macho infectado y posteriormente copulan con un carnero susceptible durante el mismo periodo de estro (Brown *et al.*, 1973).

La epididimitis causada por *B. ovis* puede pasar desapercibida por la tendencia a tener más carneros de los necesarios en los rebaños (Acosta *et al.*, 2002), la enfermedad suele aparecer tras la compra de animales infectados. Se ha señalado al carnero como un diseminador activo de la infección a través del semen. La transmisión directa de carnero a carnero es frecuente ya que los animales al estar juntos durante un largo período establecen jerarquías de dominancia, caracterizadas por comportamiento homosexual; el macho portador, con o sin lesiones pero infectado con *B. ovis*, puede transmitir la enfermedad a otro carnero por sodomía o bien, por olfateo prepucial (Bubble, 1955). En general, la incidencia de la enfermedad se incrementa con la actividad sexual y con la edad, los animales adultos tienen más probabilidades de infectarse, sin embargo, esto no significa que sean más sensibles que los jóvenes (Manazza *et al.*, 2006).

La infección natural con *B. ovis* se produce a través de las membranas mucosas (Brown *et al.*, 1973) y a pesar de que no se ha definido claramente la vía de infección, ésta se ha logrado por inoculación experimental conjuntival (Cerri *et al.*, 2002) o prepucial, con inoculos de concentración definida (3.5×10^{10} UFC/ml) y por otras vías como la intratesticular o endovenosa, con semen infectado con *B. ovis* (Paolicchi, 1999; Robles, 1998). La infección de *B. ovis* puede ocurrir a través de la mucosa rectal, pero es mediante la vía oral como se produce la mayor parte de los contagios de macho a macho. Todas las formas son posibles, sin embargo la diseminación de la enfermedad es menos común en los pequeños rebaños, en donde es reemplazada con mayor frecuencia toda la población de carneros (Hernández *et al.*, 2006; Manazza *et al.*, 2006; Robles, 1998).

Se ha logrado transmitir experimentalmente la infección a bovinos, caprinos, cobayos, conejos, ratones y ratas, pero no se han reportado casos de infección natural en estas especies (Burgess *et al.*, 1985; Kennedy *et al.*, 1956).

1.3 Patogenia

Existe muy poca información sobre la infección por *B. ovis* en situaciones de campo. El desarrollo aparentemente rápido de lesiones clínicas en un corto tiempo sugiere que la actividad sexual promueve reacciones inflamatorias en tejido testicular que acelera la retención de espermatozoides y consecuentemente, la formación de espermatocitos y/o granulomas que se detectan en la palpación del contenido escrotal (Quispe *et al.*, 2002). Otros autores indican la presencia de adherencias escrotales, resultando en granulomas espermáticos y degeneración testicular en casos crónicos (Buckrell *et al.*, 1985).

Una vez ingresada, *B. ovis* coloniza los linfonódulos regionales donde se multiplica activamente, durante 60 a 70 días, circula en sangre produciendo bacteriemia y puede aislarse en órganos como hígado, riñón, bazo y finalmente en los genitales en forma crónica, alrededor de los 30 días post infección (Biberstein *et al.*, 1964). La infección vía conjuntival o prepucial produce los cambios patológicos macroscópicos más importantes, detectables en la porción caudal del epidídimo, pudiendo extenderse a otras regiones de éste órgano. Se observan ocasionalmente alteraciones en testículos y glándulas anexas en los que se pueden detectar ciertos cambios macroscópicos como mineralización y fibrosis (Paolicchi *et al.*, 1999 y 2000).

Carneros infectados de forma natural y que excretan *B. ovis* en el semen con alto contenido de células inflamatorias y con títulos serológicos positivos por ELISA, no siempre desarrollan lesiones detectables clínicamente (Paolicchi *et al.*, 1999). Experimentalmente, la bacteria tiene un período de incubación de aproximadamente 4 a 6 semanas, tiempo en que un animal infectado comienza a eliminar la bacteria en el semen. Las lesiones, sin embargo, se manifiestan a partir de la novena semana post infección (Quispe *et al.*, 2002).

No se conoce bien la razón por la cual *B. ovis* coloniza preferentemente el tejido epididimario, sin embargo se ha asociado dicha afinidad a la anatomía de los vasos sanguíneos y a la marcada adhesividad a la superficie celular de los epitelios que poseen las *Brucellas* rugosas (Paolicchi *et al.*, 1999); también se ha reportado que la bacteria puede recuperarse del ámpula deferente, vesícula seminal, nódulos linfáticos inguinales, hígado, riñones y bazo (Acosta *et al.*, 2002). La infección por *B. ovis* también puede extenderse a los testículos, glándulas bulbouretrales o próstata diseminada, produciendo un cuadro histopatológico característico de estas infecciones genitales (Paolicchi *et al.*, 1999).

1.4 Participación del sistema inmune en la enfermedad

La participación del sistema inmune en el desarrollo de las lesiones de la epididimitis por *B. ovis* ha sido poco estudiada. Durante el curso de infecciones experimentales en carneros excretores de la bacteria en semen, no se ha logrado el aislamiento de la bacteria a partir de lesiones en glándulas anexas, este efecto podría atribuirse a la presencia de numerosas células contenedoras de inmunoglobulinas (Velasco *et al.*, 1997) tanto en glándulas bulbouretrales como en próstata (IgA) o en prepucio y uretra (IgG) (Paolicchi *et al.*, 2000). Foster *et al.*, 1988, han demostrado que el ámpula es la glándula con mayor producción local de IgA en el aparato reproductor de los carneros, contribuyendo así a impedir la invasión de *B. ovis*. Estas características inmunológicas determinarían un efectivo mecanismo para evitar la colonización de bacterias patógenas que habitan el tracto reproductor de los carneros. Se ha demostrado también, que en carneros infectados con *B. ovis* además de la IgA, también se encuentran títulos elevados de IgG en el semen y secreciones glandulares (Foster *et al.*, 1988). Otros estudios demuestran que además de la presencia de estas inmunoglobulinas durante procesos infecciosos en el tracto reproductivo, también existe un importante aumento en el número de células plasmáticas, neutrófilos y linfocitos en el semen (Clifton *et al.*, 1992; Forter *et al.*, 1988).

Estudios realizados en carneros inoculados por vía intrauretral con *A. seminis* mostraron un aumento en la respuesta inmune local, además de la presencia errática de anticuerpos contra la bacteria; también se observó una mayor cantidad de IgG en el plasma seminal a partir de la tercera semana post desafío, posiblemente como consecuencia de la trasudación de esta inmunoglobulina desde el suero al tracto, en las zonas de lesión del epidídimo y glándulas anexas (Acosta, 2006). Al igual que los espermatozoides, los lipolisacáridos (LPS) y proteínas de membrana externa (OMP) de *B. ovis*, LPS de 8-12kD y OMP de 29kD son capaces de inducir respuestas muy potentes que producen incrementos de IgG e IgM y estimulación del complemento (Paolicchi *et al.*, 1999).

Estudios realizados en ratones inoculados con esta bacteria por vía intraperitoneal, mostraron mayores niveles de IgM durante la primera semana post inoculación, disminuyendo su concentración de manera gradual. Luego de cuatro semanas post inoculación, se observó un incremento en las concentraciones de IgG2b e IL-4, la producción de esta última fue indicativa de una respuesta por parte de Th2; sin embargo, también se observó una moderada respuesta de IFN- γ e IL-2, que es indicativa de una respuesta del tipo Th1 característica en infecciones por bacterias intracelulares (Hernández *et al.*, 2009).

No se han encontrado reportes sobre la participación de células de respuesta inmune ante la infección por *B. ovis*, sin embargo en un estudio sobre epididimitis ovina inducida experimentalmente por *A. seminis* se ha descrito el aumento de células CD4, CD8, WC1, CD45RO y CD14 en vesículas y ámpulas, además de células dendríticas CD1b encontradas únicamente en ámpulas y en vesículas con procesos inflamatorios. No se reportaron aumentos significativos de dichas células en las demás glándulas anexas del aparato reproductor del carnero (Acosta *et al.*, 2007).

Varios autores han demostrado que la respuesta inmune de tipo Th1 contra bacterias intracelulares tiene mayor importancia con respecto a la del tipo Th2, y que la primera depende en gran parte de la expresión de citocinas como el IFN- γ e IL-2 producidas por células presentadoras de antígenos (Yingst y Hoover, 2003). Otros estudios han sugerido la participación de moléculas 1b ligadoras del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en la inmunidad corporal contra bacterias intracelulares, funcionando como presentadoras de antígenos que obligan al reconocimiento de epítomos bacterianos por parte de células T CD8, CD4 (α/β y γ/δ) y células NK (Hernández *et al.*, 2009; Soloski *et al.*, 2000).

La participación de la respuesta inmune del tipo celular ha sido mayormente estudiada en modelos murino con infecciones experimentales de *Brucellas* lisas. En estos modelos también se han probado protocolos de inmunización con *Brucella abortus* RB51 (una mutante atenuada de tipo rugoso de la cepa de *B. abortus* 2308), demostrando que la participación de los linfocitos T CD4 y la producción de IFN- γ por parte de estos, así como la de los linfocitos T CD8 juegan un rol importante en la defensa contra la brucelosis (Araya *et al.*, 1989). Pese a lo anterior, es necesario considerar que las respuestas del sistema inmune observadas en los experimentos mencionados, pueden no ser las mismas que se producen en una infección por *B. ovis* en carneros.

1.4.1 Autoinmunidad a causa de *B. ovis* en el aparato reproductor del carnero

Existe poca información sobre la respuesta autoinmune causada por la infección de *B. ovis*. En un estudio realizado por Paolicchi *et al.*, 2000, se demostró la presencia de anticuerpos antiespermatozoides en carneros infectados de forma experimental vía conjuntival o prepucial con esta bacteria, observando mediante histopatología la presencia de lesiones granulomatosas en epidídimos, inflamación de la vesícula seminal y ampulitis. Otros estudios realizados en humanos han demostrado la presencia de anticuerpos antiespermatozoides, linfocitos T (γ/δ y α/β) y anticuerpos (IgA) contra

Chlamyda trachomatis en el semen de hombres con y sin sinología clínica de la enfermedad (Munoz y Witkin, 1995; Witkin *et al.*, 1995).

Los testículos son órganos considerados inmunológicamente privilegiados por la presencia de la barrera hematotesticular. La esterilidad autoinmune puede suscitarse cuando se rompe esta barrera y el contenido de los túbulos seminíferos o del epidídimo se expone a las células inmunes que reconocen a los componentes antigénicos de los espermatozoides. El trauma testicular, epididimal y la vasectomía son tres formas comunes de exposición a cantidades anormales de antígenos espermáticos que inducen la generación de anticuerpos contra los espermatozoides, estos anticuerpos se han relacionado con trastornos en el transporte de espermatozoides por el tracto reproductor del macho, con alteraciones en la fertilización del óvulo. (Tanagho *et al.*, 2001).

Los espermatozoides son considerados antígenos propios, secuestrados y aislados del sistema inmunológico tempranamente por la barrera hematotesticular durante el desarrollo de la respuesta inmune. Las lesiones que afectan dicha barrera, permiten la relación entre células de respuesta inmune y el semen que pueden inducir la generación de anticuerpos contra este y contra los tejidos del tracto genital (Paolicchi *et al.*, 2000). La respuesta de los anticuerpos antiespermatozoides y su relación a la infertilidad es una de las preguntas hasta ahora sin resolver en el campo de la reproducción, se ha señalado un efecto negativo de los anticuerpos antiespermatozoides sobre la capacitación del esperma, interfiriendo en la reacción del acrosoma con la zona pelúcida del ovulo, impidiendo así la fertilización de este último, comprometiendo así la capacidad reproductiva del macho (Kim *et al.*, 1999).

Algunos autores han sugerido en estudios realizados con humanos, que la IgA dirigida contra la cola de espermatozoides está asociada con aglutinación y con una pobre penetración del moco cervical (Naz y Menge, 1994). La IgG, por su parte, estaría asociada con la inhibición de la fusión espermatozoide-ovocito en el hamster (Yanagimachi y

Rogers, 1976). Adicionalmente se ha sugerido que estos dos isotipos de inmunoglobulinas pueden actuar sinérgicamente para inhibir la fertilización (Beling y Weskler, 1974). Gubin *et al.*, 1998, demostraron en humanos que la actividad de los anticuerpos antiespermatozoides en el suero sanguíneo aumenta después de la afección inflamatoria de los testículos, y es directamente proporcional a su intensidad.

Los anticuerpos antiespermatozoides en el aparato reproductor del macho se han demostrado en suero, plasma seminal y unidos a espermatozoides. La clase de anticuerpos de mayor relevancia clínica que se fijan a espermatozoides, son del tipo IgG e IgA (Tanagho *et al.*, 2001).

1.5 Diagnóstico de epididimitis causada por *B. ovis*

La forma más práctica para detectar animales infectados por *B. ovis* es la serología, pero su uso combinado con el examen clínico y el aislamiento bacteriológico contribuyen al diagnóstico más preciso de esta enfermedad, para establecer planes de control y erradicación (Alton *et al.*, 1988).

1.5.1 Diagnóstico clínico

La palpación de los testículos y epidídimos para determinar diferencias en el tamaño, consistencia, desplazamiento dentro del saco escrotal y cambios de temperatura para el diagnóstico de epididimitis, es considerada una técnica barata y fácil de llevar a cabo (Pérez, 1997). Esta práctica tiene el inconveniente de dar solamente una pauta de la magnitud de la enfermedad, puesto que no todos los carneros infectados presentan lesiones y los resultados obtenidos no son considerados concluyentes en cuanto a la etiología, ya que se ha demostrado que otros microorganismos también pueden producir la enfermedad (Manazza *et al.*, 2006; Robles, 1998; Buckrell *et al.*, 1985).

1.5.2 Diagnóstico bacteriológico

El mejor método directo de diagnóstico es el aislamiento bacteriológico en medios de cultivo adecuados. En carneros, las muestras de semen se pueden extender directamente en placas con el medio de cultivo o bien, puede optarse por el aislamiento a partir de tejido, el cual debe macerarse y homogeneizarse antes de sembrarlos en una pequeña cantidad de solución salina fisiológica (SSF) o amortiguador de fosfato estéril (PBS) con un homogeneizador o una licuadora (Acosta *et al.*, 2007; Robles, 1998; Pérez, 1997).

B. ovis puede ser aislada en medios no selectivos como agar-sangre base enriquecido con suero ovino o bovino estéril al 10%, en agar-sangre con sangre ovina estéril al 5-10%, o medios enriquecidos como agar *Brucella*. Sin embargo en estos medios frecuentemente ocurre el desarrollo de otras bacterias que enmascaran su crecimiento y por lo tanto, puede preferirse el uso de medios selectivos como el medio modificado de Thayer-Martin (Paolicchi *et al.*, 1999; Robles, 1998).

Luego de realizar la siembra para el aislamiento de *B. ovis*, el cultivo debe mantenerse a 37 °C en una atmósfera con CO₂ al 5 - 10%. Como es una bacteria de crecimiento lento, aparece después de 3 o 4 días en medios de cultivo sólidos (Coloe *et al.*, 1984), aunque estos no deben descartarse como negativos hasta que han transcurrido 7 días (Acosta *et al.*, 2007).

1.5.3 Diagnóstico serológico

En contraste con *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* y *Brucella suis* que son *Brucellas* lisas, *B. ovis* es del tipo rugoso (Cluter *et al.*, 2005). Esta característica es importante para el tipo de pruebas que se van a usar, ya que *B. ovis* no tiene la habilidad de formar suspensiones estables y por lo tanto las pruebas basadas en aglutinación no son

de utilidad (Robles, 1998). Uno de los métodos más utilizados es la inmunodifusión doble en gel de agar (IDGA), la fijación del complemento (FC) y el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Kováčová *et al.*, 2007; Quispe *et al.*, 2002; Ficapal *et al.*, 1998; Pérez, 1997).

Varios países han adoptado distintas técnicas diagnósticas para *B. ovis*, pero la única prueba definida por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y la Unión Europea para el comercio internacional es la FC. Sin embargo se ha demostrado que la IDGA muestra una sensibilidad parecida a la técnica de FC, siendo una prueba más simple y fácil de interpretar (Kováčová *et al.*, 2007). Aunque se carece de estandarización, numerosos estudios independientes han mostrado que el ELISA es más sensible que los ensayos de FC (Manazza *et al.*, 2006).

A pesar que la Norma Oficial Mexicana contra la brucelosis en los animales (NOM-041-ZOO-1995) exige la prueba de IDGA utilizando un antígeno proteico de *B. ovis* (preparado a partir de extracción en caliente con solución salina) para la movilización y venta de reproductores ovinos y para el establecimiento de hatos libres, son escasos los laboratorios que ofrecen esta prueba a nivel nacional (Hernández *et al.*, 2006).

1.5.4 Diagnóstico molecular

El uso de técnicas indirectas basadas en la detección de anticuerpos contra *B. ovis* no siempre es satisfactorio debido a que se han demostrado resultados falso-negativos en animales infectados. A pesar de que el cultivo bacteriológico se considera el método diagnóstico más específico, es susceptible a la contaminación por otros microorganismos aun utilizando medios de cultivo selectivos (Alton *et al.*, 1988). Estos problemas en el diagnóstico han justificado el desarrollo de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que ha demostrado tener una alta especificidad en la

detección de *B. ovis*, sugiriéndola como una prueba complementaria al cultivo bacteriológico (Xavier *et al.*, 2010; Saunders *et al.*, 2007; Manterola *et al.*, 2003).

1.6 Prevención y control

Se ha recomendado la eliminación de animales que padezcan la enfermedad, la compra de animales provenientes de hatos libres y seronegativos, y la inspección clínica de los machos dos veces por año. También se ha considerado prudente mantener a los sementales y carneros nuevos separados de los adultos del rebaño, sin embargo el éxito de cualquier programa sanitario depende de su correcta planificación, de la fijación de objetivos claros y del uso de mecanismos de control con el veterinario asesor (Manazza *et al.*, 2006).

Dado que el problema se restringe a los machos, el uso de las vacunas no siempre resulta económico, se recomienda el uso de bacterinas contra *B. ovis* solo cuando la prevalencia de la enfermedad en el hato supera el 15%. Se han realizado diversos estudios para prevenir la epididimitis del carnero causada por *B. ovis* mediante la vacunación con la cepa 19 o REV-1 mostrando resultados favorables (Robles, 1998), sin embargo se ha reportado que el uso de estas vacunas tienen algunos inconvenientes, como la producción de anticuerpos indistinguibles de los producidos por la infección natural que dificultan el diagnóstico de la enfermedad, la presencia de artritis en algunos sementales, el incremento de la respuesta inmune que exacerba las lesiones epididimales en los animales infectados y la contraindicación del uso de la vacuna REV-1 en zonas libres de *B. militensis* (Alton *et al.*, 1988, West *et al.*, 1978), también se han realizado estudios con la cepa RB51 de *Brucella abortus* vacunando y desafiando a los animales, demostrando que el uso de esta vacuna no induce protección contra la enfermedad (Acosta y Tórtora, 2005).

En México la vacunación contra la enfermedad está restringida, y solo puede realizarse bajo autorización especial de la Dirección de Salud Animal. La NOM-041-ZOO-1995

prohíbe la vacunación de machos ovinos y caprinos, estableciendo como métodos de control y erradicación de la enfermedad, la castración bilateral y el sacrificio de ovinos que resulten positivos a la prueba diagnóstica en rastros autorizados, así como la compra de sementales procedentes de rebaños libres y la cuarentena de animales que ingresen a la explotación.

2. JUSTIFICACIÓN

La patogenia de la enfermedad y los mecanismos de respuesta inmune y autoinmune del tracto reproductor del macho en la epididimitis causada por *B. ovis* no han sido esclarecidos completamente. La enfermedad determina pérdidas económicas significativas en los rebaños ovinos, comprometiendo su fertilidad y por ende la productividad de las explotaciones. Conocer los aspectos patológicos e inmunológicos que participan en la infección por *B. ovis* en carneros puede permitir un mejor entendimiento de la enfermedad y una planeación más eficiente de las estrategias de prevención y control.

3. HIPÓTESIS

La respuesta inmune local y sistémica originada por la presencia de *B. ovis* en la epididimitis del carnero y los componentes de autoinmunidad contra células espermáticas en el cuadro, comprometen la eficiencia reproductiva del carnero, determinan esterilidad y provocan que la enfermedad sea irreversible.

4. OBJETIVO GENERAL

Describir la patología, la respuesta inmune y auto inmune en ovinos naturalmente infectados con *B. ovis*.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la presencia de anticuerpos contra *B. ovis*, *A. seminis* e *H. somni* en el suero sanguíneo de ovinos clínicamente sanos y con epididimitis.
2. Determinar la presencia *B. ovis*, *A. seminis* e *H. somni* mediante PCR múltiple en muestras de semen de carneros seropositivos a *B. ovis*.
3. Determinar la presencia de IgA e IgG antiespermatozoides en el suero sanguíneo de sementales sanos y naturalmente infectados con *B. ovis*.
4. Describir las alteraciones patológicas y las células de respuesta inmune participantes en la infección por *B. ovis* en el tracto reproductor de los carneros (Epidídimos, testículos y glándulas anexas).

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Obtención de las muestras

A partir de trabajos de divulgación con Fundación Produce y productores ovinos del estado de Zacatecas, se establecieron contactos que permitieron dar seguimiento a 156 rebaños con sementales afectados clínicamente por epididimitis. Se sangraron a 552 carneros para realizar el diagnóstico de *B. ovis* mediante IDGA, con esta prueba también se realizó la detección de anticuerpos contra *A. seminis* e *H. somni*, microorganismos descritos como agentes causales de epididimitis en carneros. Adicional a la colecta de sangre para la obtención de suero, se lograron reunir 114 muestras de semen para la detección de *B. ovis*, *A. seminis* e *H. somni* mediante PCR múltiple. Solo en 10 de los animales que resultaron positivos a *B. ovis* se permitió el sacrificio para obtener muestras de tejido y ser utilizadas para identificar lesiones y buscar células de respuesta inmune mediante el examen histopatológico.

Se utilizó también el suero sanguíneo de 30 hembras adultas con diferente número de partos, 30 carneros IDGA negativos a *B. ovis*, *A. seminis* e *H. somni*, y el de 30 corderas de alrededor de 4 meses de edad como grupos testigo en la prueba de ELISA indirecto para determinar la presencia de anticuerpos antiespermatozoides en carneros con epididimitis.

6.2 Lugar donde se realizaron las pruebas

Las pruebas serológicas se realizaron en el CENID-Microbiología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CENID Microbiología Animal – INIFAP), la prueba de PCR múltiple fue realizada en el Centro de Investigaciones Especializadas en Salud Animal de la Universidad Autónoma del Estado de México (CIESA – UAEM), y el estudio Histopatológico se realizó en los laboratorios de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

de la Universidad Nacional Autónoma de México (FES Cuautitlán – UNAM), todos los laboratorios equipados y con personal entrenado en estos procedimientos.

6.3 Diagnóstico serológico de la epididimitis ovina

El estudio serológico consistió en realizar pruebas de IDGA contra *B. ovis*, *A. seminis* e *H. somni* a los sueros sanguíneos obtenidos del muestreo de los carneros.

6.3.1 Antígenos para las pruebas de IDGA

Para determinar la presencia de anticuerpos contra *B. ovis* se utilizó como antígeno el extracto salino caliente de la cepa REO 198 de *B. ovis* (Myers y Siniuk 1970; Myers *et al.*, 1972), sembrada en agar-sangre bovina al 10% e incubada durante 48 horas con 10% de CO₂. Las colonias se cosecharon en PBS estéril a un volumen final de 20 ml aproximadamente, la suspensión se centrifugó a 15,000 x *g* durante 15 minutos y se descartó el sobrenadante; el precipitado obtenido fue resuspendido en 20 ml de PBS estéril y se centrifugó nuevamente a 15,000 x *g* durante 15 minutos. Posteriormente se colocó en autoclave a vapor fluente (100°C) durante 15 minutos y se dejó enfriar para ser centrifugado a 15,000 x *g* durante 15 minutos; el sobrenadante se dializó durante 48 horas y posteriormente se volvió centrifugar a 15,000 x *g*, la suspensión resultante constituyó el antígeno y se conservó a 4°C hasta su posterior uso.

El antígeno utilizado para la detección de anticuerpos contra *A. seminis* se preparó utilizando la cepa de referencia 15768 obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC), la cual se sembró en agar-sangre bovina al 10% a 37°C de 24 a 48 horas con 10% de CO₂, posteriormente fue cosechada en SSF estéril y se ajustó la concentración celular en el espectrofotómetro a una densidad óptica de 4.0 a 540 nm. La suspensión fue congelada durante 24 horas y luego de la descongelación, se sometió a 15 ciclos de 30 segundos de sonication a alta intensidad, por 30 segundos de descanso. Posteriormente se

centrifugó durante 10 minutos a 10,000 x *g*, el sobrenadante obtenido fue conservado a 4°C hasta su utilización (Williams *et al.*, 1978).

El antígeno utilizado para la detección de anticuerpos contra *H. somni* fue preparado con la cepa de referencia 2336 ATCC con el mismo procedimiento utilizado para la obtención del antígeno de *A. seminis*.

6.3.2 IDGA para la detección de anticuerpos contra *B. ovis*, *A. seminis* e *H. somni*

Para determinar la condición serológica de los carneros se empleó la prueba de IDGA señalada en la Campaña Nacional contra la Brucelosis (NOM-041-ZOO-1995). Se preparó un gel de agarosa con una solución amortiguadora de boratos (Cuadro 1), el cual se vertió en cajas de Petri desechables hasta alcanzar un espesor de 3 mm y se dejó solidificar a temperatura ambiente (Alton *et al.*, 1988), las cajas se conservaron a 4°C hasta su utilización. Para la realización de la prueba diagnóstica se perforaron siete rosetas periféricas y una central en cada caja, cada roseta con seis pozos periféricos y uno central de 4 mm y con una distancia de separación de 5 mm entre pozos.

Se colocaron 15 µl de antígeno en los pozos centrales y 15 µl de los sueros de cada carnero a evaluar en los periféricos, se incubaron las cajas en cámara húmeda durante 48 a 72 horas. Los sueros que presentaron una banda de precipitación frente al pozo que contenía el antígeno de *B. ovis*, *A. seminis* o *H. somni* fueron considerados como positivos.

Cuadro 1. Preparación de geles para IDGA

Amortiguador de boratos 0.03 M pH 8.3		Gel de agarosa*		
-	Ácido bórico (H_3PO_3)	1.86 g	- Agarosa	0.8 g
-	Cloruro de potasio (KCl)	7.27 g	- Amortiguador de boratos	5 ml
-	Agua destilada	950 ml	- Solución NaCl al 5%	93 ml

*agregar 1 ml de azida de sodio al 1% y mezclar.

6.4 Detección de *B. ovis*, *A. seminis* e *H. somni* en semen mediante PCR múltiple

Se colectaron a la par del sangrado de los ovinos, 114 muestras de semen mediante electroeyaculado previa asepsia de la zona prepucial, las cuales fueron conservadas en congelación. 14 de ellas provinieron de animales que resultaron seropositivos únicamente a *B. ovis* y se emplearon para el diagnóstico de infección por alguna de las tres bacterias mediante reacción en cadena de la polimerasa múltiple (PCR múltiple).

Para la extracción del ADN a partir de las muestras obtenidas se empleó una prueba comercial (QIAamp® DNA Mini Kit. QIAGEN, Alemania). El ensayo se realizó bajo las indicaciones del fabricante, utilizando 100 µl de semen para la extracción, el DNA obtenido fue resuspendido en 50 µl de amortiguador AE provisto por el fabricante de la prueba.

Para realizar la PCR múltiple se utilizó la prueba *Multiplex PCR Kit*® (QIAGEN, Alemania), los iniciadores (*primers*) para la amplificación de los fragmentos de DNA de cada bacteria fueron diseñados de acuerdo a las características descritas por Saunders *et al.* (2007) (Cuadro 2). El volumen final para la reacción fue de 50 µl, constituido como se muestra en el Cuadro 3. Las condiciones para la reacción fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 96°C durante 10 minutos, 35 ciclos con etapas de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineación a 57°C durante 60 segundos y extensión a 72°C durante 60 segundos; por último se realizó una extensión final a 72°C durante 6 minutos (Cuadro 4).

Los productos finales de la PCR múltiple fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% preparado en una solución amortiguadora de Tris base 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM (TAE 1X), se utilizó como amortiguador de corrida la

misma solución mezclada con bromuro de etidio (Sigma-Aldrich, Australia) a una concentración final de 0.5 µg/ml para lograr la visualización de bandas de DNA con luz UV.

Cuadro 2. Especificaciones de los iniciadores utilizados para la PCR múltiple

Especie	Iniciador	Secuencia del iniciador (5' - 3')	Producto final (pb)*
<i>B. ovis</i>	ISP1	GGTTGTTAAAGGAGAACAGC	690
	ISP2	GACGATAGCGTTTCAACTTG	
<i>A. seminis</i>	SRJAS1	CTTATCTTTCTTAAGCCCTGAC	436
	SRJAS2	AAGAAAAAGACGAAGAGACATT	
<i>H. somni</i>	HS-453-F	GAAGGCGATTAGTTTAAGAG	313
	HS-765-R	ACTCGAGCGTCAGTATCTTC	

* pb. pares de bases

Cuadro 3. Concentraciones utilizadas para la PCR múltiple

Componente	Volumen/Reacción	Concentración final
2x QIAGEN <i>Multiplex PCR Master Mix</i>	25 µl	1X (3mM de Mg ²⁺)
Iniciadores (<i>Primers</i>)	0.5 µl de C/U	0.1 µM/iniciador
5x <i>Q-Solution</i>	10 µl	1X
Muestra de ADN	1 µl	≤1 µg de ADN/reacción
H ₂ O libre de RNasas	8 µl	-
Volumen final de reacción	50 µl	

Cuadro 4. Condiciones para llevar a cabo la PCR múltiple

Etapas de la reacción	Temperatura y tiempo	Ciclos
Desnaturalización total	96°C durante 10 min	---
Desnaturalización	94°C durante 30 seg	35
Alineación (unión del cebador)	57°C durante 60 seg	
Extensión de la cadena	72°C durante 30 seg	
Extensión final	72°C durante 6 min	---
Incubación	4°C ∞	---

6.5 Detección de anticuerpos antiespermatozoides en suero sanguíneo

6.5.1 Antígeno para la detección de anticuerpos antiespermatozoides

Para la detección de los anticuerpos (IgA e IgG) antiespermatozoides mediante ELISA indirecto, se preparó un antígeno espermático a partir de una mezcla de eyaculados obtenidos de sementales ovinos clínicamente sanos y seronegativos a *B. ovis*, *A. seminis* e

H. somni. Los espermatozoides obtenidos fueron lavados y centrifugados a 10,000 x *g* dos veces con PBS estéril pH 7.2, luego de descartar el sobrenadante se realizó una sensibilización del cuello espermático con 10 ml de una solución 15 mM de KCl, 5 mM de CaCl_2 , 12.5 mM de Na_2HPO_4 , 2.5 mM de NaH_2PO_4 , 0.4 mM de EDTA y 20 mM de Tris-HCl pH 8.0, la suspensión se mantuvo en agitación durante 10 minutos (Batova *et al.*, 1996).

La separación de las cabezas de los espermatozoides se realizó sometiendo la suspensión a 7 ciclos de 30 segundos de sonificado a alta densidad, por 30 segundos de descanso, posteriormente se centrifugó a 10,000 x *g* durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla con partes iguales de una solución de EDTA 0.4 mM y Tris-HCl 20 mM pH 8.0, nuevamente se centrifugó a 10,000 x *g* y se descartó el sobrenadante (Batova *et al.*, 1996).

Para purificar las cabezas de los espermatozoides se resuspendió la pastilla en una solución 1 M de sucrosa, se agregó una parte mas de una solución 1:1 de Tris HCl 20 mM pH 8.0 y tritón X-100 al 0.1% y se incubó en baño maría a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugó la suspensión a 10,000 x *g* durante 10 minutos, la pastilla se lavó por última vez con Tris-HCl 20 mM pH 8.0 y se centrifugó a 10,000 x *g*. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en PBS estéril pH 7.2, el antígeno obtenido fue conservado en alícuotas de 1ml a 4°C hasta su uso (Batova *et al.*, 1996).

6.5.2 ELISA indirecto para la detección de anticuerpos antiespermatozoides

El ELISA indirecto utilizado para la detección de isotipos IgA e IgG contra espermatozoides se estandarizó enfrentando diluciones de sueros y antígeno, hasta obtener el valor óptimo de dilución de 1:200 en PBS para ambos casos (Cuadro 5). Se colocó 50 μl del antígeno diluido en cada pozo de las microplacas de poliestireno y se incubó toda la noche a 37°C. Al día siguiente se lavaron los pozos 3 veces con PBS-Tween 20 al 0.05%, se bloquearon con una solución de albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS estéril pH 7.2, posteriormente se volvieron a incubar a 37°C por 60 minutos y se lavaron 3 veces con PBS-

Tween 20. Las microplacas se cubrieron con papel aluminio y se almacenaron en refrigeración a -4°C hasta su uso.

Del suero sanguíneo diluido de los machos IDGA positivos y negativos a *B. ovis*, así como el de las hembras y corderas, se tomaron 50 µl y se colocaron por duplicado en los pozos de las microplacas y se incubaron a 37°C toda la noche, posteriormente se lavó cada pozo con PBS-Tween 20 tres veces y se colocaron 50 µl de conjugado peroxidado anti-IgA de borrego preparado en conejo (Bethyl, Montgomery, USA) en una dilución 1:2000, se incubó 2 horas y posteriormente se lavó con PBS-Tween 20. Para el isotipo IgG los sueros se incubaron durante una hora y posterior al lavado de los pozos, se colocaron 50µl de conjugado peroxidado anti-IgG de oveja obtenido en conejo (Bethyl, Montgomery, USA) en una dilución de 1:5000. El revelado se realizó adicionando 50 µl de ABTS líquido (Amresco, Ohio, USA), dejando las placas en agitación durante 30 minutos, posteriormente se leyó la absorbancia a 405 nm de longitud de onda (OD) en un lector de ELISA (VICTOR³_{TM} 1420 Multilabel Counter. PerkinElmer, USA).

Cuadro 5. Concentraciones de los sueros y conjugados para el ELISA

Conjugado	Muestra	Dilución de la muestra	Dilución del conjugado	Tiempo de incubación de la muestra	Tiempo de incubación del conjugado	Tiempo de revelado
Anti IgG	Suero	1:200	1:5000	Una noche	1 hora	30 min
Anti IgA	Suero	1:200	1:2000	Una noche	2 horas	30 min

6.5.3 Determinación de proteínas antigénicas de los espermatozoides ovinos

El antígeno espermático utilizado para la detección de anticuerpos antiespermatozoides en el suero sanguíneo de los ovinos fue sometido a una prueba de inmunotransferencia (Neal, 1981; Towbin *et al.*, 1979) para conocer las proteínas que resultaron antigénicas en los grupos desafiados en el ELISA. Las proteínas contenidas en el antígeno espermático fueron separadas por peso molecular en un gel de poliacrilamida al

12.5% durante 50 minutos a 85 V, posteriormente se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 45 minutos a 400 mA. Luego de la transferencia, la membrana fue bloqueada con leche descremada al 5% en PBS durante dos horas.

La membrana de nitrocelulosa se dividió en cuatro partes, cada una de ellas se desafió con un anticuerpo primario, el cual consistió en una mezcla de los sueros de cada grupo previamente diluidos para la detección de isotipos IgA e IgG antiespermatozoides. Las membranas se incubaron a 4°C durante una noche con los anticuerpos primarios, posteriormente fueron lavadas dos veces con PBS–Tween 20 al 0.05% durante 5 minutos y desafiadas con proteína A conjugada con peroxidasa (Invitrogen, California, EUA) como anticuerpo secundario durante 2 horas. Se lavaron las membranas tres veces con PBS-Tween 20 durante 5 minutos, y dos veces mas con PBS. Finalmente se revelaron las bandas en las que hubo reconocimiento antigénico.

6.6 Obtención de muestras de tejido y examen histopatológico

De 10 carneros que resultaron serológicamente positivos a *B. ovis*, se colectaron muestras de testículo y epidídimo mediante sacrificio humanitario o castración. Las muestras se conservaron en formol amortiguado al 10% para su estudio histopatológico; de 7 animales se logró obtener también muestras de vesícula seminal, glándula bulbouretral, ámpulas del conducto deferente, uretra pélvica y próstata diseminada. Las muestras fueron procesadas por el método de inclusión en parafina de rutina, y teñidas con Hematoxilina-Eosina, las laminillas obtenidas de esta técnica se utilizaron para la descripción de lesiones y células de respuesta inmune presentes en la epididimitis causada por *B. ovis*.

6.7 Análisis estadístico

Para conocer la significancia estadística entre los grupos en los que se determinó la presencia de anticuerpos antiespermatozoides se utilizó un modelo lineal generalizado, posteriormente se empleó un ANOVA para conocer las diferencias entre grupos e isotipos de inmunoglobulinas. Para todas las pruebas utilizadas se consideró diferencia significativa con $P < 0.05$.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Diagnóstico serológico de epididimitis ovina

De los 552 sueros de carneros del estado de Zacatecas evaluados, 90 (16.5%) resultaron seropositivos a *B. ovis*, 17 (3%) a *A. seminis* y 36 (6.5%) a *H. somni*. En 14 carneros se demostraron resultados serológicos positivos a más de una de las bacterias evaluadas (Cuadro 6); un animal resultó seropositivo a los antígenos de las tres bacterias, cinco resultaron positivos a *B. ovis* e *H. somni*, cuatro a *B. ovis* y *A. seminis*, y cuatro más a *A. seminis* e *H. somni*.

Cuadro 6. Resultados serológicos positivos contra *B. ovis*, *A. seminis* e *H. somni* obtenidos mediante IDGA

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

Méndez *et al.*, 1999, realizaron un estudio en carneros del altiplano mexicano en el cual se diagnosticó la presencia de anticuerpos contra *B. ovis* y *A. seminis* en 111 sueros, 9% de ellos resultaron positivos a *B. ovis* y 9% más a *A. seminis*, demostrando la presencia de ambos anticuerpos en 5 animales mediante IDGA. En ese mismo estudio, los resultados obtenidos en un ELISA para detectar anticuerpos contra *B. ovis* mostró una seroprevalencia de 22.5%. Acosta *et al.*, 2006, utilizaron la prueba de IDGA para detectar la presencia de anticuerpos contra *A. seminis* en carneros experimentalmente infectados con la bacteria por diferentes vías de inoculación, obteniendo resultados variables.

Carrera *et al.*, 2013, reportan una prevalencia de 18.6% para *B. ovis* en 153 rebaños de Zacatecas utilizando la prueba de IDGA, el 10.5% de esos rebaños presentaron al menos un semental seropositivo, siendo las explotaciones ovinas que utilizan el sistema de producción semi-intensivo las que tienen una prevalencia más elevada (86.1%), seguido del sistema extensivo con 11.9% y el de traspatio con 2.0%, sin embargo el sistema intensivo no registró positivos; en ese estudio también se observó que la prevalencia de *B. ovis* fue más alta en los rebaños más grandes y con mayor número de vientres y sementales, relacionándola principalmente con el sistema de explotación empleado, más que a la relación hembra:macho o al sistema de empadre utilizado. Acosta y Tórtora, 2005, mencionan que la prevalencia de la enfermedad por *B. ovis* oscila entre el 5% y el 100%, dependiendo de las características del rebaño estudiado y la introducción de nuevos sementales. En el presente trabajo se encontró una frecuencia para *B. ovis*, *H. somni* y *A. seminis* de 16.3%, 6.52% y 3.07% respectivamente.

El uso de la prueba de IDGA para el diagnóstico de *B. ovis* ha demostrado tener una alta especificidad (100%) pero baja sensibilidad (92%) (Ridler y West, 2011), en combinación con el ELISA la sensibilidad aumenta hasta el 100% (Scalman, 1992), sin embargo la IDGA ha sido recomendada como prueba tamiz para el diagnóstico de la enfermedad (Núñez *et al.*, 1997). Para la realización de la prueba, el antígeno preparado a partir del extracto salino caliente de *B. ovis*, ha mostrado mejores resultados en cuanto a sensibilidad y especificidad (Ridler y West, 2011). La variabilidad de las pruebas serológicas en respuesta a las bacterias estudiadas en animales con aislamientos positivos en semen y aún en animales experimentalmente infectados, indica que los resultados deben emplearse con reserva cuando se desconoce la condición de una población de carneros y cuando se logran resultados positivos, la evidencia sugiere que las respuestas falso negativas son abundantes en esta patología, lo que puede explicarse por la baja sensibilidad de la prueba de IDGA.

No se encontró literatura que describa a la IDGA como prueba diagnóstica para la epididimitis causada por *H. somni* en poblaciones de ovinos naturalmente infectadas. Esta bacteria se asocia a la flora normal del aparato reproductor del carnero y en ocasiones está relacionada con la epididimitis, también se ha descrito como un patógeno asociado con infecciones del aparato respiratorio de rumiantes, como causante de inflamación de la glándula mamaria, conjuntivitis y septicemia (Stephns *et al.*, 1981; Frederick y Eugene, 1989); por lo que el valor diagnóstico de la IDGA o de cualquier otra prueba serológica dirigida a esta bacteria sería poco confiable, considerando su carácter de oportunista y que se lograron resultados positivos combinados con respuestas a *B. ovis* y *A. seminis*.

7.2 Detección de *B. ovis*, *A. seminis* e *H. somni* mediante PCR múltiple

En las 14 muestras de semen de carneros IDGA positivos a *B. ovis* sometidas a la prueba de PCR múltiple, *B. ovis* fue el microorganismo más comúnmente detectado, su ADN fue amplificado en nueve de las muestras (Figura 1), en una de ellas también se detectó *A. seminis*, aunque en el análisis serológico de la muestra no se encontraron anticuerpos contra *A. seminis*. Ninguna muestra resultó positiva a *H. somni*.

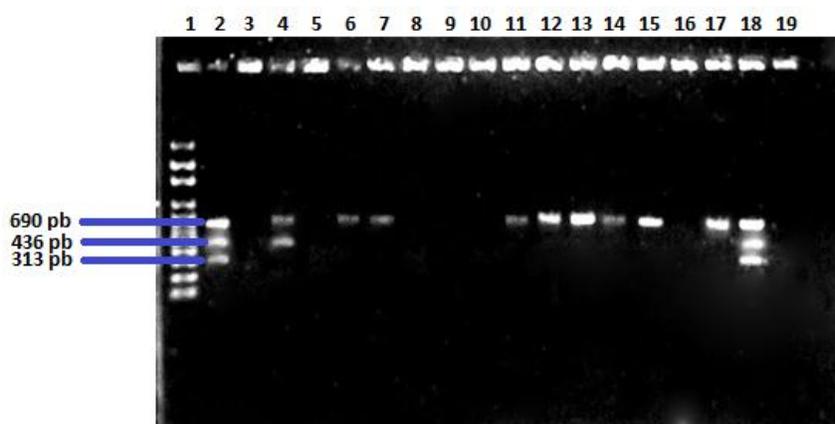


Figura 1. Productos obtenidos en PCR múltiple a partir de ADN bacteriano en semen

1, marcador. 2 y 18, controles positivos. 3 y 19, controles negativos. 4 – 17, ADN obtenido a partir de semen ovino.

Se ha utilizado la PCR para demostrar la presencia de *B. ovis* en el semen de carneros, sugiriéndola como una prueba complementaria al cultivo bacteriológico (Manterola *et al.*, 2003; Saunders *et al.*, 2007). Por otra parte, se ha demostrado que en muestras de semen de animales serológicamente positivos no siempre se logra el aislamiento bacteriológico (Worthington *et al.*, 1985). En este trabajo las muestras de semen provinieron únicamente de animales IDGA positivos a *B. ovis*, de las cuales 9 de 14 resultaron positivas a la PCR, la discrepancia en los resultados puede deberse a que el curso de la enfermedad y el tiempo de incubación en los carneros estudiados, no alcanzó en todos los casos la excreción de la bacteria en el fluido seminal y a que la eliminación de la bacteria por semen no es continua.

En un trabajo realizado por Saunders *et al.*, 2007, con 295 muestras de semen colectadas mediante vagina artificial y electro eyaculado, se reportó una mayor presencia de *H. somni*, seguido de *A. seminis* y *B. ovis* mediante PCR múltiple; cabe mencionar que en este estudio la colecta de material seminal se realizó mediante electro eyaculado previa asepsia de la zona prepucial de los sementales, en los resultados obtenidos se observó una mayor presencia de *B. ovis*, solo se demostró la presencia de *A. seminis* en una muestra y no fue posible demostrar la presencia de *H. somni*. La variación en los resultados de ambos trabajos puede deberse a que las muestras estudiadas en este caso fueron obtenidas de animales previamente demostrados como IDGA positivos a *B. ovis*, o bien al manejo realizado previo a la colecta de las muestras.

7.3 Autoinmunidad contra células espermáticas y determinación de proteínas antigénicas de los espermatozoides ovinos

La presencia de anticuerpos antiespermatozoides en carneros infectados con *B. ovis* fue mayor en comparación con los otros grupos ($p < 0.05$), los carneros clínicamente sanos presentaron la menor cantidad de anticuerpos de todos los grupos. Las ovejas y corderas presentaron niveles similares de estos anticuerpos (Figura 2).

Con respecto a las DO observadas entre grupos y el tipo de inmunoglobulina detectada en cada uno de ellos, se observaron mayores títulos de IgA en los carneros naturalmente infectados con *B. ovis* en comparación con los otros tres grupos (hembras, corderas y machos clínicamente sanos) que no presentaron diferencias significativas entre ellos ($P < 0.05$). En el isotipo IgG, se observaron DO más elevadas en el grupo de carneros infectados y de corderas, en comparación con el grupo de hembras, el grupo de machos clínicamente sanos fue el que mostró DO más bajas ($P < 0.05$).

La prueba de inmunotransferencia demostró que las proteínas antigénicas reconocidas por los anticuerpos antiespermatozoides en los machos IDGA positivos, hembras y corderas presentaron pesos de 14.6 y 17.8 KDa.

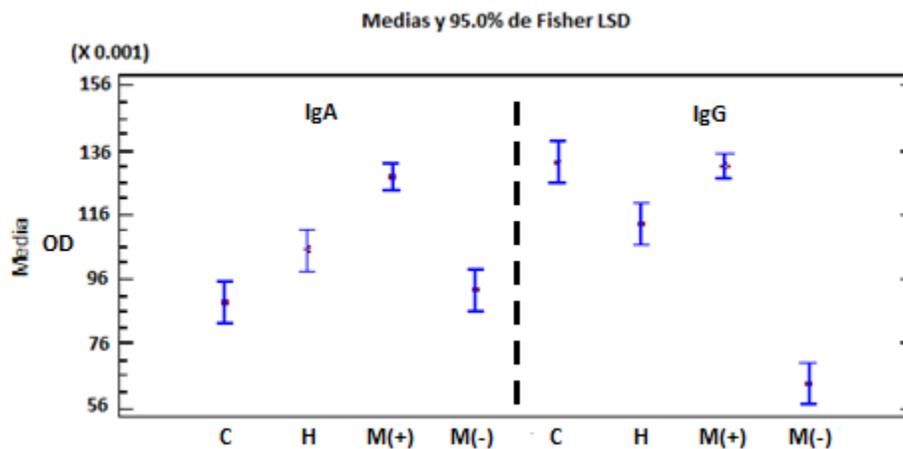


Figura 2. Comparación de medias de densidades ópticas por cada grupo e isotipo de inmunoglobulina

OD. densidades ópticas, C. corderas, H. hembras, M(+). machos seropositivos a *B. ovis*, M(-). machos seronegativos a *B. ovis*

Cuevas *et al.*, 2007, reportaron la presencia de anticuerpos antiespermatozoides en carneros infectados experimentalmente con *A. seminis*, observando una mayor DO en los carneros, que en sueros de corderos y corderas que fueron utilizados como grupo testigo. Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los de Cuevas *et al.*, 2007, pero adicionalmente, los sueros de carneros seronegativos a *B. ovis*, *A. seminis* e *H. somni*, mostraron DO menores a los demás grupos (carneros infectados, corderas y hembras),

sugiriendo que la respuesta antiespermática está directamente relacionada con la epididimitis.

Por otra parte, Paolicchi *et al.*, 2000, demostraron la presencia de anticuerpos antiespermatozoides en un elevado porcentaje de animales infectados de manera experimental con *B. ovis* a partir de la tercera semana posinfección, reportando también que observaron leucocitos en el semen de dichos animales durante el examen andrológico. Las lesiones en testículos y epidídimos con reclutamiento de células de respuesta inmune en el semen, pueden explicar la presencia de anticuerpos antiespermatozoides en carneros infectados con *B. ovis*, estas lesiones alteran la barrera hematotesticular y permiten una interacción de las células de respuesta inmune con los espermatozoides, generando anticuerpos contra células espermáticas y otras células de los tejidos del tracto genital (Naz y Menge, 1994; Witkin y Toth, 1983; Eggert *et al.*, 1996; Mazumdar *et al.*, 1998; Sanoka *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2012).

La demostración del isotipo IgG antiespermatozoides en hembras y corderas en mayores títulos que en los machos IDGA negativos resulta llamativa, resultados similares se encontraron en el trabajo de Cuevas *et al.*, 2007. Mazumdar y Levine, 1998, mencionan que los espermatozoides son considerados como antígenos extraños, debido a que no están presentes hasta después de la pubertad y se desarrollan en un sitio inmunoprivilegiado. Sin embargo Flickinger *et al.*, 1997, sugieren que la presencia de anticuerpos antiespermatozoides en el suero sanguíneo de ratas Lewis machos clínicamente sanos después de la maduración sexual, está relacionada con una diferenciación de antígenos espermáticos que son procesados y presentados al sistema inmune bajo condiciones normales. Es posible que los niveles de anticuerpos observados en el suero de las corderas estén relacionados con los procesos de maduración del tracto reproductor durante el inicio de la pubertad.

Es probable que la presencia de títulos más elevados de anticuerpos antiespermatozoides en las hembras con respecto a los sementales IDGA negativos esté asociada a traumatismos en el tracto genital durante el manejo reproductivo (inseminación artificial pericervical o intrauterina, prácticas poco frecuentes en México), o bien, a la exposición de material seminal durante procesos inflamatorios en el aparato genital de las hembras. Mazumdar *et al.*, 1998, mencionan que la producción de anticuerpos anti espermatozoides en mujeres ocurre bajo diferentes circunstancias, el daño ocasionado de forma mecánica o química en la mucosa del tracto genital femenino puede ocasionar la exposición de antígenos espermáticos, y finalmente la formación de anticuerpos contra los espermatozoides. Witkin y Toth, 1983, demostraron que la formación de anticuerpos anti espermatozoides puede ocurrir como consecuencia de una inflamación local luego de un proceso infeccioso en el aparato reproductor de las mujeres. Sin embargo, aún no se ha demostrado por completo cual es la razón por la cual las hembras no desarrollan en la mayoría de los casos, anticuerpos contra espermatozoides luego de repetidas exposiciones. James y Hargreave, 1984, demostraron la existencia de sustancias inmunosupresoras en el plasma seminal de humanos, estas sustancias tienen la función de proteger a los espermatozoides del daño inmunológico, así como prevenir la sensibilización de la mujer a los antígenos de espermatozoides después del coito.

Flickinger *et al.*, 1997, demostraron mediante inmunotransferencia la presencia de proteínas antigénicas en espermatozoides (20-22, 26, 35, 37, 42, 54-55, 63, 65, 68, 78, 75-72 y > 100 KDa) reconocidas por anticuerpos presentes en el suero sanguíneo de ratas Lewis machos. La discrepancia en la cantidad y pesos moleculares de las proteínas antigénicas descritas por Flickinger *et al.*, con respecto a las observadas en el presente estudio puede estar relacionada con el desarrollo fisiológico y la especie animal con la que se trabajó.

7.3 Descripción de lesiones histopatológicas en carneros con epididimitis clínica causada por *B. ovis* y células de respuesta inmune observadas

En las muestras evaluadas histológicamente, en todos los casos los órganos examinados presentaron infiltrados de células linfocíticas, plasmáticas y macrófagos, con excepción de la glándula bulbouretral (Figura 3). Las lesiones en testículos y epidídimos fueron más severas con necrosis y formación de granulomas con presencia de células gigantes multinucleadas.

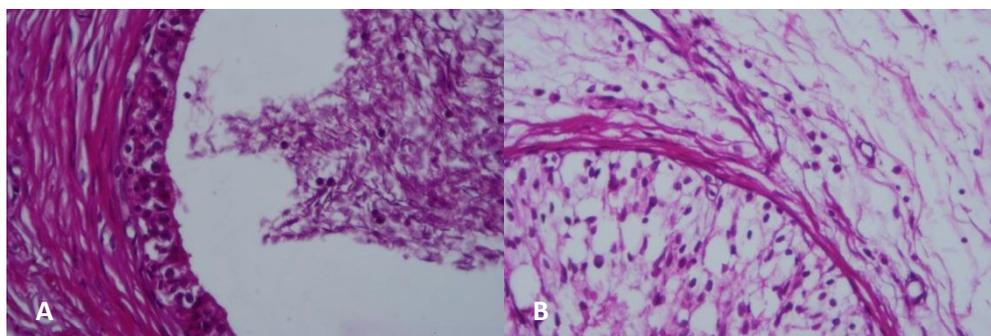


Figura 3. Infiltrados celulares observados en epidídimos de carneros con epididimitis

A. Infiltrado linfocitario y presencia de células plasmáticas en el epitelio del epidídimo y células de respuesta inmune en la luz entre los espermatozoides. B. Infiltrado de linfocitos, células plasmáticas y algunos macrófagos en epitelio y tejido conjuntivo del epidídimo.

B. ovis y *A. seminis* se han recuperado de ámpula deferente y vesícula seminal (Acosta *et al.*, 2006) y ocasionalmente se han observado alteraciones en testículos y glándulas anexas (Al-Katib y Dennis, 2008; Paolicchi *et al.*, 2000), se ha reportado también la presencia de lesiones granulomatosas e infiltrados de linfocitos y células plasmáticas idénticos a los causados por *B. ovis* en el epidídimo de animales experimentalmente infectados con *A. seminis* (Acosta, *et al.*, 2006). En el presente trabajo, las muestras de tejido recibidas para diagnóstico histopatológico presentaron lesiones coincidentes con las descritas por otros autores (Carvalho *et al.*, 2012; Robles, 1998a; Burgess, 1982), siendo la más frecuente la presencia de infiltrados celulares de linfocitos y células plasmáticas.

Aunque en este trabajo la mayor parte de las muestras de testículos y epidídimos que presentaron lesiones (7 de 11 muestras), también resultaron positivas a *B. ovis* en la prueba de IDGA, Ficapal *et al.*, 1998, en un estudio epidemiológico con 110 carneros de diferentes rebaños de Cataluña (España) observaron que no existió correlación entre los resultados serológicos, bacteriológicos y las lesiones de la enfermedad. Blasco, 1990a, mencionan que el examen clínico de los testículos y epidídimos tiene poco valor diagnóstico en el caso de la infección por *B. ovis*, debido a que existen animales que sufren la enfermedad, pero no presentan signos clínicos de ella y pueden infectar a otros carneros. También se han descrito otras bacterias como *Actinobacillus seminis*, *Histophilus somni*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Pasteurella multocida*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus fecalis* y *Escherichia coli* como causantes de epididimitis en carneros (Hernández *et al.*, 2006; Manazza *et al.*, 2006; Robles, 1998; Buckrell *et al.*, 1985; DeLong *et al.*, 1979; Cox *et al.*, 1977), por lo que el diagnóstico bacteriológico a partir de tejido lesionado o semen es necesario para completar el diagnóstico de la enfermedad, permitiendo tomar medidas de control y profilaxis adecuadas y efectivas (Acosta *et al.*, 2007; Pérez, 1997; Robles, 1998b; Robles *et al.*, 1998).

8. CONCLUSIONES

La presencia de linfocitos, macrófagos, células plasmáticas y monocitos en zonas lesionadas del tracto reproductor de carneros con epididimitis clínica causada por *B. ovis*, la exposición de células espermáticas a estos tipos celulares y la presencia de anticuerpos antiespermatozoides en el suero sanguíneo de los machos IDGA positivos, demuestran la participación de mecanismos inmunes y autoinmunes en la epididimitis del carnero causada por *B. ovis* y la importancia de estos en la evolución irreversible de dichos cuadros clínicos hacia la esterilidad en los carneros afectados.

El uso adecuado de las diferentes pruebas para el diagnóstico de epididimitis ovina, así como la combinación de algunas de ellas, permite la detección oportuna de animales infectados que aún no presentan signos clínicos, además de permitir implementar mejores estrategias de prevención y control contra *B. ovis* y evitar estrategias equivocadas cuando se trata de otros agentes causantes de epididimitis, que de todas formas comprometen la eficiencia productiva y reproductiva de los rebaños ovinos.

El manejo reproductivo de los ovinos es una práctica que debe realizarse en condiciones salubres, ligada al constante monitoreo serológico y eliminación de animales que puedan participar como portadores de agentes causales de epididimitis, evitando así que estos animales comprometan la fertilidad y en consecuencia, la productividad del rebaño.

9. LITERATURA CITADA

- Acosta DJ, Buendía A, Tenorio GV, Suárez GF, Tórtora PJ. Distribución de linfocitos CD4, CD8, TCR $\gamma\delta$, células CD45RO, macrófagos (CD14) y células dendríticas (CD1b) en las glándulas anexas al aparato reproductor de carneros inoculados con *Actinobacillus seminis*. Vº Congreso de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos. 2007. Mendoza, Argentina.
- Acosta DJ, Días AE, Arellano RB, Tórtora PJ. Inducción Experimental de epididimitis en ovinos por inoculación intrauretral con *Actinobacillus seminis*: Estudio bacteriológico, serológico e Histopatológico. Téc Pec Méx. 2006. 44:257-267.
- Acosta DJ. Patología y respuesta inmune en el aparato reproductor del carnero en la infección experimental con *Actinobacillus seminis*. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México – Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. 2006. México. D.F.
- Acosta DJ, Tórtora PJ. Epidemiología, prevención y control de la Epididimitis ovina. En: “Enfermedades de importancia económica en Producción animal” Ed. Roger I. Rodríguez V.; Mc Graw-Hill-Interamericana - Univ. Autónoma de Yucatán. 2005. Cap.23, 379-392
- Acosta DJ, Palomares RG, Hernández AL, Herrera LE, Aguilar RF. Estudio bacteriológico y serológico de un brote de epididimitis por *Brucella ovis*. XXVI Congreso Nacional de Buiatía. 2002. Acapulco, Gro, México. Del 10 al 12 de Julio.
- Al-Katib WA, Dennis SM. Pathological changes in accessory sex organs of rams following experimental infection with *Actinobacillus seminis*. N Z Vet J. 2008. 56:319-325.
- Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. *Brucella ovis*. En: “Techniques for the brucellosis laboratory”. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). 1988. Cap.5, 157–167.
- Araya LN, Elzer PH, Rowe GE, Enright FM, Winter AJ. Temporal development of protective cell-mediated and humoral immunity in Balb/c mice infected with *Brucella abortus*, J Immunol. 1989. 143:3330.

- Batova IN, Petrov M, Kyurkchiev JD, Kehayov IR. Characterization of a sperm nuclear protein. *Am J Reprod Immunol*. 1996. 36:49-57.
- Beling CG, Weskler ME. Suppression of mixed lymphocyte reactivity by human chorionic gonadotropin. *Clin Exp Immunol*. 1974. 18:537-541.
- Biberstein EL, McGowan B, Olande H, Kennedy PC. Epididymitis in rams. *Cornell Vet*. 1964. 54:27-41.
- Blasco JM. La epididimitis contagiosa del morrueco. En *Brucelosis Ovina, tratado de patología y producción ovina*. Moriyón UI, Editores. 1990a. Zaragoza, España. 89-96.
- Blasco JM. *Brucella ovis*. En *Animal Brucellosis*. Nielsen and Duncan, Editores. 1990b. Boca ratón, Florida, Estados Unidos. 453.
- Brown GM, Pietz DE, Price DA. Estudios on the transmission of *Brucella ovis* infection in rams. *Cornell Vet*. 1973. 63:29-40
- Buddle, M. Observation on the transmission of *Brucella* infection in sheep. *New Zealand Vet J*. 1955. 3:10-19.
- Buckrell BC, McEwen SA, Johnson WH, Savage NC. Epididymitis Caused by *Brucella ovis* in a Southern Ontario Sheep Flock. *Can Vet J*. 1985. 26:293-296.
- Burgess GW. Ovine contagious epididymitis: a review. *Vet Microbiol*. 1982. 7:551-575.
- Burgess GW, Spencer TL, Norris MJ. Experimental infection of goats with *Brucella ovis*. *Aust Vet J*. 1985. 62:262-264.
- Carrera ChJ, Echavarría ChF, Aréchiga FC, Bañuelos VR, Tórtora PJ. Posibles factores de riesgo en la prevalencia serológica de *Brucella ovis* en Zacatecas, México. *Rev Mex Cienc Pecu*. 2013. 4:61-74
- Carvalho CA, Moustacas VS, Xavier MN, Costa EA, Costa LF, Silva TM, Paixao TA, Borges AM, Gouveia AM, Santos RL. Andrological, pathologic, morphometric, and ultrasonographic findings in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. *S Rum Res*. 2012. 102:213-222.
- Cerri D, Ambrogi C, Ebani V, Poli A, Cappelli F, Cardini G, Andreani E. Experimental *Brucella ovis* infección in muflon (*Ovis musimon*). *J Wild Dis*. 2002. 38:287-290.

- Clifton VL, Husband AJ, Kay DJ. Local immunity in the male reproductive tract. *Immunol Cel Biol.* 1992. 70:301–307.
- Coloe PJ, Sinclair AJ, Slattery JF, Burke D. Differentiation of *Brucella ovis* from *Brucella abortus* by Gas-Liquid Chromatographic Analysis of Cellular Fatty Acids. *J Clin Microbiol.* 1984. 19:896 898.
- Cox JC, Gorrie CJ, Nairin RC, Ward HA. A comparison of methods for the serological diagnosis of *Brucella ovis* infection. *Br Vet J.* 1977. 133:442-445.
- Cuevas PM, Hernández AL, Acosta DJ, Lara SV, Tórtora PJ. Demostración de anticuerpos antiesperma en carneros experimentalmente infectados con *Actinobacillus seminis*. XIV Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Técnicos Especialistas en Ovinocultura A.C. 2007. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. 11 y 12 de Septiembre.
- Cutler SJ, Whatmore AM, Commander NJ. A review Brucellosis – new aspects of an old disease. *J Appl Microbiol.* 2005. 98:1270–1281.
- DeLong WJ, Waldhalm DG, Hall RF. Bacterial isolates associated with epididymitis in rams from Idaho and earstern Oregon flocks. *Am J Vet Res.* 1979. 40:101-102.
- Eggent W, Bublinger N, Rohr G, Probst S, Aufenanger J, Naber H, Runnebaum B. Antibodies to *Chlamydia trachomatis* in semen and relationship with parameters of male fertility. *Hum Reprod.* 1996. 11:1408–1417.
- Ficapal A, Jornada J, Blasco J, Moriyon I. Diagnosis and epidemiology of *Brucella ovis* infection in rams. *S Rum Res.* 1998. 29:13–19.
- Flickinger CJ, Howards SS, Baran ML, Pessoa N, Herr JC. Appearance of “natural” antisperm autoantibodies after sexual maturation of normal Lewis rats. *J Reprod Immunol.* 1997.33:127–145.
- Foster RA, Ladds PW, Husband AJ, Hoffmanns D. Immunoglobulins and immunoglobulin-containing cells in the reproductive tracts of rams naturally infected with *Brucella ovis*. *Aust Vet J.* 1988. 65:37-40.
- Frederick W, Eugene D. The *Haemophilus somnus* disease complex (Haemophilosis): A review. *Can Vet J.* 1989. 30:816–822.

- Gubin DA, Dmochowski R, Kutteh WH. Multivariate analysis of men from infertile couples with and without sperm antibodies. *Am J Reprod Immunol*. 1998. 39:157-60.
- Hernández LM, Salas TE, Núñez AA, Ugalde RA, Tenorio GV, Hernández CR, Suarez GF, Díaz AE. Immune response produced by *Brucella ovis* and mutants in *virB10* and *virB11* in murine model. *J Anim Vet Adv*. 2009. 8:928-934.
- Hernández AL, Palomares RG, Herrera LE, Acosta DJP, Díaz AE. Epididimitis ovina por *brucella ovis*. Estudios serológicos realizados durante cinco años. XXX Congreso Nacional de Buiatría. 2006. Acapulco, Gro, México. Del 9 al 11 de Agosto.
- James K, Hargreave TB. Immunosuppression by seminal plasma and its possible clinical significance. *Immunol Today*. 1984. 5:357-363.
- Kennedy, PC, Frazier LM, McGowan B. Epididymitis in rams: Pathology and Bacteriology. *Cornell Vet*. 1956. 46:303-319.
- Kim A, Parish J, Momont W, Lun P. Effect of experimentally generated bull antisperm antibodies on *in vitro* fertilization. *Biol Reprod*. 1999. 60:1285-1291.
- Kováčová D, Zubrický P, Babinčáková M, Trávníček M. Importance of serological diagnostics in ovine epididymitis caused by *Brucella ovis*. *Bull Vet Inst Pulawy* 2007. 51:219-224.
- Manazza J, Spath E, Paolicchi F. Brucellosis ovina. *Rev Col Vet Prov Bs As*. 2006. 11:42-44.
- Manterola L, Tejero GA, Ficapal A, Shopayeva G, Blasco JM, Marin CM, López GI. Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in semen samples from rams. *Vet Microbiol*. 2003. 92:65-72.
- Mazumdar S, Levine AS. Antisperm antibodies: etiology, pathogenesis, diagnosis and treatment. *Fertil Steril*. 1998. 70:799-810.
- Méndez NG, Díaz AE, Morales AJ, Aguilar RF, Suárez GF. Epididimitis ovina: estudio bacteriológico y serológico. *Vet Mex*. 1999. 30:329-336.
- Munoz MG, Witkin SS. Autoimmunity to spermatozoa asymptomatic *Chlamydia trachomatis* genital tract infection and $\gamma\delta$ T lymphocytes in seminal fluid from the male partners of couples with unexplained infertility. *Hum Reprod*. 1995. 10:1070-1074.

- Myers DM, Siniuk AA. Preliminary report on the development of a diffusion-in-diffusion method for the diagnosis of ram epididymitis. *App Microbiol.* 1970. 19:335–337.
- Myers DM, Jones LM, Varela-Diaz VM. Studies of antigen for complement fixation and gel diffusion test in the diagnosis of infections caused by *Brucella ovis* and other *Brucella*. *App Microbiol.* 1972. 23:895–902.
- Naz RK, Menge AC. Antisperm antibodies: Origin, regulation and sperm reactivity in human infertility. *Fertil Steril.* 1994. 61:1001-1013.
- Neal Burnette W. 'Western blotting': electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate — polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analyt Biochem (United States: Academic Press)* 1981. 112:195–203.
- Nian QL, Shu WZ. Inhibitory effects of human seminal plasma on an ELISA used to detect anti-sperm antibodies: Implications for the determination of sperm quality. *J Reprod Immunol.* 2000. 47:33-40.
- Norma Oficial Mexicana, NOM-041-ZOO-1995. Campaña Nacional contra la Brucelosis en los animales. *Diario Oficial*, 20 de agosto de 1996.
- Núñez TE, Días AE, Velázquez QF, Trigo TF, Suárez GF. Presencia de anticuerpos contra diferentes especies de *Brucella* en sementales ovinos jóvenes. *Vet Mex.* 1997. 28:241-245.
- Paolicchi FA, Casaro PA, Gimeno EJ, Kortebani LG, Mazzolli AB. Antisperm response in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. *S Rum Res.* 2000. 36:7–15.
- Paolicchi F, Cipolla A, Vagnoni L, Cobo E, Vagnozzi A, Ramondino R, Silva P, Vigliocco A. Aislamiento de *Brucella ovis* del semen de carneros seropositivos al test de ELISA y clínica genital normal. *Rev Arg Microbiol.* 1999. 31:40-43.
- Pérez E, Flores CR, De la Huerta JA, Trigo TJ. Diagnóstico y descripción de un brote de epididimitis ovina en México originado por *Brucella ovis*. *Vet Mex.* 1979. 10:221–226.

- Pérez HS. Evaluación de la protección conferida a carnerillos inmunizados con Cepa RB51, frente a una infección experimental con *Brucella Ovis*. Tesis de licenciatura. Universidad Austral de Chile. 1997. Valdivia, Chile.
- Quispe CR, Rivera GH, Rosadio AR. Cinética de la infección por *Brucella ovis* en carneros durante una época de empadre. *Inv Vet Perú*. 2002. 13:61-66.
- Ridler AL, West DM. Control of *Brucella ovis* infection in sheep. *Vet Clin Food Anim*. 2011. 27:61-66.
- Robles CA. Epididimitis contagiosa de los carneros por *Brucella ovis*. *Rev Med Vet*. 1998a. 79:67-71.
- Robles CA. Evaluación de una técnica de doble difusión en gel de agar para el diagnóstico de la infección por *Brucella ovis* en carneros. *Vet Arg*. 1998b. 15:119-124.
- Robles CA, Uzal FA, Olaechea FV, Low C. Epidemiological observations in a Corriedale Flock affected by *Brucella ovis*. *Vet Res Commun*. 1998. 22:435-443.
- Rodolakis A, Bernard K. Isolation of *Chlamydia* from the genitalia of rams affected by clinical epididymitis. *Bull Acad Vet Fr*. 1977. 50:65-70.
- Sanoka D, Fraczek M, Jedrzejczak P, Szumala A, Kurpisz M. Male genital tract infection: an influence of leukocytes and bacteria on semen. *J Reprod Immunol*. 2004. 62:111-124.
- Saunders VF, Reddacliff LA, Berg T, Hornitzky M. Multiplex PCR for the detection of *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* and *Histophilus somni* in ram semen. *Austr Vet J*. 2007. 85:72-77.
- Scalman CM. Etiopathogenesis of epididymitis in ram lambs. *Memorias del V Congreso Nacional de Producción Ovina, Asociación Mexicana de Técnicos especialisas en Ovinocultura*. 1992. Monterrey Nuevo León, México. Del 1 al 4 de abril. 342-349.
- Sergeant ES. Seroprevalence of *Brucella ovis* infection in commercial ram flocks in the Tamworth area. *N Z Vet J*. 1994. 42:97-100.
- Soloski MJ, Szperka ME, Davies A, Wooden SL. Host immune response to intracellular bacteria: A role of MCH-Linked Class-1b Antigen-Presenting molecules (44536). *PSBEM*. 2000. 244:231-239.

- Stephns LR, Little PB, Wilkie BN, Barnum DA. Humoral immunity in experimental thromboembolic meningoencephalitis in cattle caused by *Haemophilus somnus*. Am J Vet Res. 1981. 42:468–473.
- Suárez GF, Martínez YE, Flóres CR. Presencia de anticuerpos contra *B. ovis* en Borregos Tabasco o Pelibuey. En Resúmenes de la XI Reunión Anual del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias – S. A. G. 1974. México, D. F.
- Tanagho EE and Mc Aninch J.W. Urología general de Smith. 12 Edic. Manual Moderno. 2001. México. D.F.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA. 1979. 76:4350–4354.
- Velasco J, Díaz R, Grilló MJ, Barberán M, Marín C, Blasco JM, Moriyón I. Antibody and Delayed-Type Hypersensitivity responses to *Ochrobactrum anthropi* cytosolic and Outer Membrane Antigens in Infections by smooth and rough *Brucella* spp. Clin diagn lab immunol. 1997. 4:279-284.
- 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 Assoc. 1986. 188:393–396.
- West DM, Johnstone AC, Bruere AN, Chapman HM.. Epiphysitis in rams following vaccination against *Brucella ovis* infection. N Z Vet J. 1978. 26:133-134.
- Williams MJ, Smith GL, Muldock MF. Immunogenicity of a *Haemophilus somnus* bacterin in cattle. Am J Vet Res. 1978. 39:1756–1762.
- Witkin SS, Toth A. Relationship between genital tract infections, sperm antibodies in seminal fluid, and infertility. Fertil Steril. 1983. 40:805–8.
- Worthinton RW, Stevenson BJ, de Liste GW. Serology and semen culture for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in chronically infected rams. N Z Vet J. 1985. 33:84–87.
- Xavier M, Silva T, Acosta E, Paixao T, Moustacas V, Calvaho C, Sant’Anna F, Robles C, Gouveia A, Lage A, Tsolis R, Santos R. Development and evaluation of a species-

specific PCR assay for the detection of *Brucella ovis* infection in rams. Vet Microbiol. 2010. 145:158–164.

Yanagimachi H, Rogers BJ. The use of zona free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. Biol Reprod. 1976. 15:471-476.

Yingst S, Hoover DL. T cell Immunity to Brucellosis. Crit Rev Microbiol. 2003. 29:313–331.