



UNIVERSIDAD DEL ZULIA
REVISTA CIENTÍFICA



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN

MARACAIBO, ESTADO ZULIA, VENEZUELA



EVALUACIÓN SEROLÓGICA Y CLÍNICO PATOLÓGICA A TRAVÉS DE LAS PRUEBAS DE IGDA y ELISA EN CARNEROS INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE CON *Brucella ovis*

Serological and Clinicopathological Evaluation Through the AGID and ELISA Tests in Rams Experimentally Inoculated With *Brucella ovis*

Víctor Manuel Sánchez-Parra^{1,2}, Edgardo Soriano-Vargas¹, Claudia Giovanna Peñuelas-Rivas¹, Ruy Ortiz-Rodríguez², Fernando Alberto Paolicchi³, Valente Velázquez-Ordoñez¹, Martín Talavera-Rojas¹ y Jorge Acosta-Dibarrat^{1*}

¹Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Km 15.5 Carretera, 50200 TolucaAtlatomulco. México; ² Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, Michoacán, México; ³Lab. Bacteriología Grupo de Sanidad Animal INTA, Est. Exp. Agrop. Balcarce. Facultad Cs. Agrarias UNMdP.
Correspondencia: *jpacostad@uaemex.mx

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue caracterizar los hallazgos patológicos y su relación con los resultados clínicos y serológicos en carneros infectados experimentalmente (IE) con *Brucella ovis*. Se utilizaron 18 carneros de 1 a 4 años y libres de *B. ovis*; que se distribuyeron en tres grupos: Grupo 1 (n= 6): inoculación en mucosas (*B. ovis*); Grupo 2 (n= 6), inoculación vía intravenosa y Grupo 3 (n= 6) Control. Se llevó a cabo el seguimiento de un carnero⁻¹ grupo⁻¹ durante 189 días (d) post-IE. Se obtuvieron muestras de 2 mL de suero sanguíneo y semen entre los días 0 y 189 post-IE para realizar pruebas serológicas de Inmunodifusión en Gel de Agar (IGDA) y ELISA. El semen se procesó por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa PCR. El análisis estadístico se realizó mediante modelos categóricos y mediciones repetidas. ELISA mostró mayor sensibilidad ($P<0,05$) para la detección de carneros seropositivos (CS) a partir del d 3 post-IE, a los 21 d post-IE, alcanzó su máxima detección de CS (100%) en ambos grupos IE ($P<0,05$). En el d 56 post-IE, la tasa de CS comenzó a disminuir ($P<0,05$). En 83% de los CS no se logró el aislamiento de *B. ovis* por cultivo bacteriano ni PCR. Se presentaron lesiones induradas: 50% en testículo derecho y 33,3% en testículo izquierdo, en carneros con IE vía endovenosa. En este grupo, el 16,6% de CS presentaron adherencias y granulomas en cabeza, cuerpo y cola del epidídimo derecho. La utilización de la prueba de IGDA, la cual es la establecida por la Norma Oficial Mexicana (NOM-041-ZOO-1995) imposibilitaría la detección temprana de animales seropositivos lo que restaría eficacia a los programas de control de la enfermedad.

Palabras clave: Epididimitis ovina; *Brucella ovis*; IGDA; ELISA.

ABSTRACT

The aim of this research was to characterize the pathological findings and their relationship with clinical and serological results in rams experimentally infected (EI) with *Brucella ovis*. It was used 18 rams from 1 to 4 years old and free from *B. ovis*. They were divided into three groups: Group 1 (n = 6): inoculation (*B. ovis*) via mucosal; Group 2 (n = 6), intravenous inoculation and, Group 3 Control (n = 6). Ram⁻¹ group⁻¹ was monitored for 189 days (d) post-EI. Blood serum samples of 2 mL and semen were obtained between 0 and 189 d post-EI to perform serological tests of agar-gel immunodiffusion and ELISA; whereas, the semen was processed by polymerase chain reaction PCR. The statistical analysis was performed using categorical models and repeated measurements. ELISA showed a higher sensitivity ($P < 0.05$) for the detection of seropositive rams (CS) from the 3 d post-EI and, at 21 d post-EI, reached its maximum detection of CS (100%) in both groups EI ($P < 0.05$). On the 56th post-EI d the CS rate started to decrease ($P < 0.05$). At 83% of the CS, the presence of *B. ovis* was not found using either PCR or bacterial isolation. The lesions with indurations were: 50% in the right testicle and 33.3% in the left testicle, in EI rams via intravenous, and in this group, 16.6% of CS presented adhesions and granulomas in the head, body and tail of the right epididymis. The use of the IGDA test, which is established by the Official Mexican Standard (NOM-041-ZOO-1995), would make it impossible to detect seropositive animals early, which would make the disease control programs less effective.

Key words: Ovine epididymitis; *Brucella ovis*; AGID; ELISA.

INTRODUCCIÓN

La epididimitis causada por *Brucella ovis* (*B. ovis*) es una enfermedad contagiosa de transmisión venérea que causa falla reproductiva [3], y se caracteriza por producir epididimitis, subfertilidad e infertilidad en carneros (*Ovis aries*) [2, 9]. En los carneros, las lesiones crónicas causadas por *B. ovis* se restringen al aparato genital, específicamente al epidídimo y eventualmente testículos y glándulas asociadas al aparato reproductor; por lo que, dichas lesiones provocan significativas pérdidas económicas a nivel mundial [1, 28], en consecuencia, se requiere del diagnóstico temprano. Al respecto, las técnicas de diagnóstico serológico más utilizadas incluyen Inmunodifusión en Gel de Agar (IGDA), ELISA, y fijación de Complemento [2, 28].

De acuerdo con investigaciones, en torno a los efectos de *B. ovis*, se sugiere que máximo el 50% de los carneros infectados muestran lesiones palpables en el epidídimo [2] y algunos animales infectados por esta bacteria presentan un efecto reducido en la calidad espermática. Sin embargo, otros individuos afectados por *B. ovis* mostraron disminución en la motilidad, concentración y morfología del espermatozoide. Así mismo, la tasa de abortos en las hembras y de muerte perinatal varían (1 a 2%) [11]. No obstante, los estudios experimentales, aunque reducidos [6, 17, 20], reportan tasas de aborto entre 0 y 8% [11]. Por ello, el objetivo de la presente investigación fue caracterizar los hallazgos clínicos patológicos y la respuesta serológica en carneros infectados experimentalmente con *B. ovis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal de la Universidad Autónoma del estado de México (UAEM) (40°24'59,87" N) durante los meses de marzo a noviembre, 2012. El estudio fue aprobado por el comité de Bioética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UAEM con fecha 26/06/2012.

Animales

Se emplearon dieciocho carneros de las razas Columbia, Romanov y Pelibuey, todos con edad entre 1-4 años. Los carneros procedían de un establecimiento libre de *B. ovis*. Se constató que los animales no presentaban signos de epididimitis mediante el examen clínico, también fueron sometidos a dos pruebas serológicas de IGDA y cultivo bacteriológico en semen y en lavado prepucial, las cuales resultaron negativas. Los animales fueron alimentados *ad libitum* con heno avena (*Avena sativa*) y alimento comercial (14% Proteína cruda).

Los carneros se distribuyeron aleatoriamente en tres grupos (n= 6 grupo⁻¹) y sometidos a los siguientes tratamientos: Grupo 1 inoculación en mucosas: instilación de *B. ovis* en la mucosa conjuntival y prepucial con 0,5 mL de inóculo con una concentración de 3,9X10⁹ unidades formadoras de colonias (UFC) en ambas mucosas, Grupo 2: inoculación de *B. ovis* vía

intravenosa con la aplicación de 1 mL del inóculo en la vena yugular a la misma concentración y Grupo 3: Control al que se le administró instilación conjuntival y prepucial de 0,5 mL de solución salina al 0,9% (SS). La instilación en conjuntiva se realizó en el ojo izquierdo de cada animal con el volumen y concentración antes mencionados, mientras que la administración prepucial consistió en la introducción del inóculo o la SS según el grupo usando una jeringa sin aguja y posterior masaje con la abertura prepucial cerrada.

Preparación del inóculo de desafío

Se inocularon placas de agar sangre con la cepa de campo *B. ovis* 01Zac-INIFAP obtenida del epidídimo de un carnero con epididimitis en el estado de Zacatecas, México, que se incubaron a 37°C durante 48 horas (h), en una atmósfera con 10% de CO₂. Se cosecharon con SS. Al inóculo se le realizó conteo de UFC [14] y se estandarizó a una concentración de 3,9x10⁹ UFC/mL.

Examen clínico

Se realizó el examen clínico del aparato genital previo a los muestreos, registrando las lesiones y su ubicación en el testículo y el epidídimo. A las lesiones se les clasificó en grados de la siguiente manera: grado uno (*), carneros con lesiones leves que incluyeran edema y problemas de deslizamiento; grado dos (**), lesiones mayores que incluyeran induraciones y grado tres (***), casos con lesiones mayores que incluyeran adherencias y granulomas.

Muestreo

De los carneros de cada grupo se colectaron muestras de sangre para la obtención de suero para realizar las pruebas serológicas IGDA y ELISA y semen para la detección de *B. ovis* por PCR, a lo largo de 6 meses en los días (d) 0; 3; 7; 13; 21; 28; 42; 56; 70; 80; 105; 147; 167 y 189 completando un total de 14 muestreos. Las muestras de sangre (5 mL), se obtuvieron en tubos estériles (BD Franklin Lake NJ, EUA), se separó el suero por centrifugación (Becton Dickinson Clay Adams, EUA) y se conservaron -80°C en ultra congelador (Thermo Fisher Scientific/ Revco, ULT1786-3-A40, EUA) hasta utilización.

La extracción del semen se realizó con electroeyaculador (transformador 12 VCT, 500 mA, de fabricación propia), con sujeción del animal en decúbito lateral y protrusión del pene y colección en vial estéril el cual fue conservado en congelación a -80°C hasta su utilización [10].

A los carneros se les practicó eutanasia, el sacrificio de los animales se realizó como lo establece la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (SAGARPA) en la Norma Oficial Mexicana [21]. Previa electro insensibilización a los 189 d posteriores a la infección experimental (IE), *post-mortem* se extrajeron las glándulas seminales, ámpulas del conducto deferente, glándulas bulbouretrales, testículos, cola, cuerpo y

cabeza de los epidídimos e inmediatamente se obtuvieron las muestras correspondientes de cada órgano 1 cm³ para realizar los estudios de histología y cultivo bacteriológico. Para los estudios histopatológicos, las muestras se fijaron en formol amortiguado al 10% con excepción de los testículos, mismos que se fijaron en solución de Bouin. Se incluyeron en parafina y se realizaron cortes en micrótopo (Nicom GmbH, HM 325, Alemania), de 5 µm de espesor que se tiñeron con hematoxilina y eosina.

Bacteriología de semen y órganos del aparato reproductor

Para la realización de estudios bacteriológicos, las muestras de semen y órganos del aparato reproductor fueron transportados inmediatamente al laboratorio. Para el caso de las muestras de órganos, éstas fueron maceradas con SS en bolsa estéril y cultivados en Agar Sangre y Agar Sangre Skirrow en condiciones microaerofílicas durante 7 d [17].

Prueba de PCR para diagnóstico de *B. ovis* en semen

De las muestras de semen se extrajo el ADN con el kit comercial Kapa express extrac (KAPA BIOSYSTEMS, Boston Massachusetts, EUA), se siguieron las instrucciones del fabricante utilizando para la extracción de ADN 8 mL de semen, una vez completada la extracción se suspendió el ADN en 25 mL de solución buffer de Tris-HCl a 10 mM y EDTA a 0,1 M (TE) y se almacenó a -20°C en refrigerador (Delca Científica, VPC-200-MIX, México), hasta realizar el PCR. Para la prueba de PCR se utilizó un kit comercial de PCR (QIAGEN, Alemania), los iniciadores utilizados fueron ISP1 (5'-GGTTGTTAAAGGAGAACAGC-3') e ISP2 (5'-GACGATAGCGTTTCAACTTG-3') [13, 16]. El volumen final para la reacción fue de 25 µL y se constituyó por 12,5 µL 2x QUIAGEN Master Mix, 0,5µL de cada iniciador, 5 µL de 5xQ-solution, 6 µL de H₂O libre de RNasas y 1µL del ADN extraído.

La amplificación del ADN se realizó en termociclador (BIO-RAD, T100, EUA) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de a 96°C durante 10 minutos (min), 35 ciclos con las etapas de desnaturalización a 94°C por 30 segundos (seg), alineación a 57°C durante 60 seg y extensión de la cadena a 72°C durante 60 seg; finalmente se realizó una extensión final a 72°C durante 6 min permaneciendo en el termociclador a 4°C hasta realizar la corrida electroforética. Los productos de la PCR se corrieron en cámara de electroforesis (VWR, © Midi 10 Electroforesis System, EUA), en gel de agarosa al 1% preparado en una solución amortiguadora de Tris base 40 mM, ácido acético 20 mM y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (TAE 1X), para la corrida se utilizó como amortiguador la misma solución usando Brumuro de Etidio (APEX, Et Br Dropper Bottle) a una concentración de 0,5 mg/mL para visualizar las bandas de ADN con luz ultravioleta (UV) en un transluminador (DNr Bio-Imaging Systems, Mini bis 16mm, Israel). Una clara banda de 690 pb fue considerado positivo.

Prueba de Inmunodifusión en Gel de Agar (IGDA)

Para la prueba de IGDA se utilizó el antígeno HS, obtenido por extracción salina caliente, suministrado por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), la prueba se realizó sobre un gel de agar noble, NaCl, y tampón borato; dicho gel se colocó en placa de petri formando un lecho de 2,5 milímetros (mm) de profundidad el cual se perforó con roseta que tiene un pozo central rodeado por seis pozos separados entre sí y el central con 3 mm [24], en el pozo central se colocaron 30 mL del antígeno y en los pozos periféricos se depositaron los sueros problema con controles positivos y negativos. Posteriormente se realizó la incubación a temperatura ambiente en cámara húmeda y se procedió a la realización de las lecturas a las 24; 48 y 72 h [7].

Prueba de ELISA

Se utilizó el kit de ELISA (CHEKIT BRUCELLA OVIS, IDEEX, Suiza) para detección de anticuerpos de *B. ovis* en suero, se siguieron las recomendaciones del fabricante. El kit posee placas de 96 pozos sensibilizadas con el antígeno, sueros controles positivo y negativo, solución tapón para lavado y para realizar la dilución de los sueros, conjugado (anticuerpo anti IgG ovina conjugado con peroxidasa), sustrato, solución de paro de la reacción.

Se realizaron diluciones de 1/200 de los sueros problema, así como de los controles positivo y negativo, los cuales fueron distribuidos en la placa de microtitulación que posee antígeno contra *B. ovis* en un volumen de 100 µL pozo. La placa se cubrió con papel de aluminio y se incubó por 1h a 37°C y se realizaron tres lavados con solución de lavado (CHEKIT wash solution). Se agregó el anticuerpo antirrumiante conjugado con peroxidasa (CHEKIT Antiruminant-IgG-PO-Conjugate), se tapó la placa y se incubó 1h a 37°C. Posteriormente, se realizaron tres lavados y se añadió el sustrato (CHEKIT-TBM-Substrate): 100 µL por pocillo. Se incubó por 15 min a temperatura ambiente con agitación continua, se agregó la solución de paro (CHEKIT-Stop Solution TBM) y finalmente se realizó la lectura en lector de placas de ELISA a 405 nm (BIO-TEK, ELx800, EUA).

El lector de placas de ELISA fue conectado a un equipo de cómputo al que previamente se le instaló el programa XChk 3.3 (IDEXX, Maine, EUA), mismo que proporciona valores (%) que permiten clasificar las muestras en positivos ($\geq 50\%$), sospechosos ($\geq 10\%$ a 50%) y negativos ($< 10\%$). La prueba se consideró válida cuando la diferencia entre los promedios de los controles positivo y negativo fue $\geq 0,3$ de densidad óptica (DO) y los controles positivos no excedieron 2,0 de DO, y los negativos no sobrepasaron 0,5 de DO.

Análisis estadístico

Con la información recabada se elaboró una base de datos para su análisis estadístico mediante las metodologías de

TABLA I
RESULTADOS DE LAS PRUEBAS SEROLÓGICAS Y HALLAZGOS CLÍNICOS EN TESTÍCULO Y EPIDÍDIMO DE ACUERDO CON EL GRUPO Y CARNERO

Grupo	Serología		Testículo		Epidídimo Derecho			Epidídimo Izquierdo			
	ID	IGDA	ELISA	Dcho	Izdo	Cza	Cpo	Cola	Cza	Cpo	Cola
Mucosas	39	+	+	*	*	*	NDL	**	*	*	**
	44	+	+	*	**	NDL	NDL	*	NDL	**	*
	68	+	+	*	**	**	NDL	*	*	*	**
	67	+	+	NDL	**	**	NDL	**	**	**	**
	61	+	+	*	*	*	*	**	**	**	**
	37	-	+	NDL	*	*	*	**	**	**	**
Porcentaje	83,3 ⁺	100,0 ⁺	66,6 [*] 33,3 ^{NDL}	50,0 [*] 50,0 ^{**}	50,0 [*] 33,3 ^{**} 16,6 ^{NDL}	33,3 [*] 66,6 ^{NDL}	33,3 [*] 66,6 ^{**}	33,3 [*] 50,0 ^{**} 16,6 ^{NDL}	33,3 [*] 66,6 ^{**}	16,6 [*] 83,3 ^{**}	
Endovenoso	45	+	+	*	*	NDL	NDL	*	NDL	**	**
	36	-	+	**	**	NDL	NDL	NDL	**	*	**
	49	+	+	*	*	NDL	NDL	NDL	***	***	***
	38	+	+	NDL	*	*	NDL	**	**	**	**
	56	-	+	**	*	**	NDL	**	*	**	**
	50	+	+	**	**	**	**	**	**	**	**
Porcentaje	66,6 ⁺	100 ⁺	33,3 [*] 50,0 ^{**} 16,6 ^{NDL}	66,6 [*] 33,3 ^{**}	16,6 [*] 33,3 ^{**} 50,0 ^{NDL}	16,6 [*] 83,3 ^{NDL}	16,6 [*] 50,0 ^{**} 33,3 ^{NDL}	16,6 [*] 50,0 ^{**} 16,6 ^{***} 16,6 ^{NDL}	33,3 [*] 66,6 ^{**}	83,3 ^{**} 16,6 ^{***}	
Control	35	-	-								
	58	-	-								
	43	-	-								
	40	-	-								
	42	-	-								
	65	-	-								
Porcentaje	0,0 ⁺	0,0 ⁺					100 ^{NDL}				

IGDA= pruebas serológicas de inmunodifusión en Gel de Agar

ELISA= prueba serológica Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

ID= Identificación del carnero; Dcho= Derecho; Izdo= Izquierdo, Cza= Cabeza; Cpo= Cuerpo

+ = Seropositivo; - = Seronegativo.

*= grado uno, lesiones leves que incluyeran edema y problemas de deslizamiento; ** = grado dos, lesiones mayores que incluyeran induraciones; ***= grado tres, lesiones mayores que incluyeran adherencias y tumoraciones; ^{NDL}= No se detectaron lesiones.

Modelos Categóricos (CATMOD, siglas en inglés) y Modelos de Efectos Fijos para aplicar el método de mediciones repetidas y las diferencias entre grupos se obtuvieron a través del método de Ji cuadrado (X^2) para el caso del análisis mediante CADMOD y medias de mínimos cuadrados (LsMeans, siglas en inglés) para el caso de mediciones repetidas, ambos métodos a un $\alpha < 0,05$ [8, 12].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Serología

De acuerdo con los resultados de las pruebas serológicas, se pudo observar que, los carneros del grupo control se mostraron

negativos durante todos los muestreos del estudio, tanto en la prueba IGDA como en la de ELISA (TABLA I). Para el caso de los resultados, de acuerdo con la prueba serológica y el grupo, la prueba de ELISA detectó mayor tasa de seropositivos (100%), durante el tiempo del trabajo experimental (189 d) post-infección experimental (IE), tanto en el grupo de carneros infectados vía mucosas como en el grupo de carneros IE con *B. ovis* vía endovenosa. Mientras que la prueba de IGDA, detectó 83,3 y 66,6% de carneros seropositivos en los grupos IE por vía mucosas y endovenosa, respectivamente (TABLA I).

En relación con el análisis estadístico utilizando la información obtenida durante los 189 d de muestreo post- IE, se pudo observar

TABLA II
TIEMPO MÍNIMO PARA DIAGNOSTICAR SEROPOSITIVIDAD Y MÁXIMA SEROPOSITIVIDAD EN CARNEROS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON *Brucella ovis*

Prueba/Vía de infección	Tiempo mínimo			Máxima seropositividad		
	Día post-infección	Tasa (%) promedio	EE	Día post-infección	Tasa (%) promedio	EE
ELISA/Mucosa	3	33 ^a	14	21	100 ^a	14
ELISA/Endovenosa	3	50 ^{ab}	14	28	100 ^a	14
IGDA/Endovenosa	13	17 ^a	14	28	50 ^b	14
IGDA/Mucosa	13	17 ^{ac}	14	70	67 ^b	14

EE= error estándar;
 Literales ^{a, b} indican diferencias ($P<0,05$) dentro de columna

TABLA III
TIEMPO MÍNIMO PARA DIAGNOSTICAR SEROPOSITIVIDAD Y MÁXIMA SEROPOSITIVIDAD EN CARNEROS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON *Brucella ovis*

Prueba/Vía de infección	Tiempo mínimo			Máxima seropositividad		
	Día post-infección	Tasa (%) promedio	EE	Día post-infección	Tasa (%) promedio	EE
ELISA/Mucosa	3	33 ^a	14	21	100 ^a	14
ELISA/Endovenosa	3	50 ^{ab}	14	28	100 ^a	14
IGDA/Endovenosa	13	17 ^a	14	28	50 ^b	14
IGDA/Mucosa	13	17 ^{ac}	14	70	67 ^b	14

EE= error estándar;
 Literales ^{a, b} indican diferencias ($P<0,05$) dentro de columna

efecto de la prueba serológica sobre la tasa de detección de seropositivos para *B ovis* ($P<0,001$) independientemente de la vía de infección utilizada en esta investigación (mucosas o endovenosa), lo mismo sucedió con la interacción prueba serológica*vía de infección (TABLA II).

En cuanto a la mayor efectividad de las pruebas analizadas, ELISA fue la que detectó mayor tasa de seropositividad ($P<0,05$), tanto en carneros infectados por mucosas como por vía endovenosa. Sin embargo, se estableció que a partir del d 3 post-IE, la prueba de ELISA presentó una tendencia hacia una mayor detección de seropositivos: 33 y 50% en carneros IE vía endovenosa y mucosas, respectivamente. Mientras que en el d 21 post-IE esta prueba alcanza su máxima detección en carneros IE en ambos grupos (100%), ello en comparación con la prueba IGDA, la cual solo detecta seropositivos a partir del d 13 post-IE (17%), hasta el d 70 post-IE es cuando detecta la máxima tasa de seropositividad ($P<0,05$) en carneros IE vía mucosas (67%) o endovenosa (50%) (TABLA III). Posterior a los 70 d post-IE, la prueba detecta menor cantidad de seropositivos (FIG. 1).

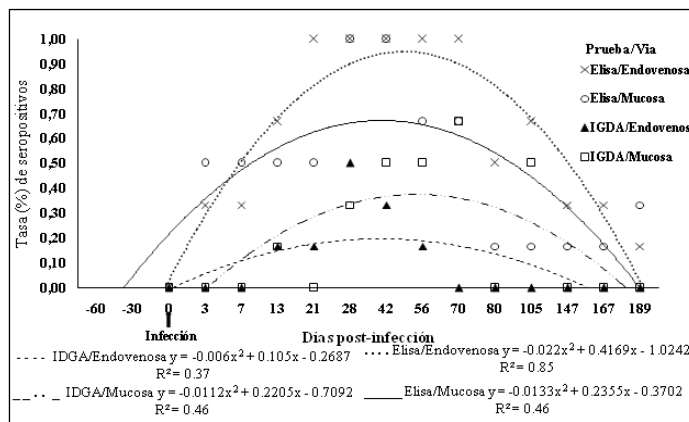


FIGURA 1. COMPORTAMIENTO DE LAS PRUEBAS SEROLÓGICAS (ELISA VS IGDA) PARA LA DETERMINACIÓN DE SEROPOSITIVIDAD DE EN BORREGOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON *Brucella ovis* DE ACUERDO CON LA VÍA DE INFECCIÓN (MUCOSA O ENDOVENOSA) Y LOS DÍAS POST-INFECCIÓN.

En cuanto al comportamiento de la prueba de ELISA de acuerdo con el grupo, se observó que, la tasa de seropositivos fue mayor ($P<0,05$) en el grupo IE vía endovenosa (52%) vs grupo IE vía mucosas (40%). Mientras que la tasa de sospechosos fue \leq

15% en los grupos endovenoso y mucosas (FIG. 2), por lo que se realizaron pruebas subsecuentes para validar los resultados en este estudio. En este sentido, se encontró que en la mayoría de los casos, los animales sospechosos en las pruebas subsecuentes presentaron seropositividad a *B. ovis*.

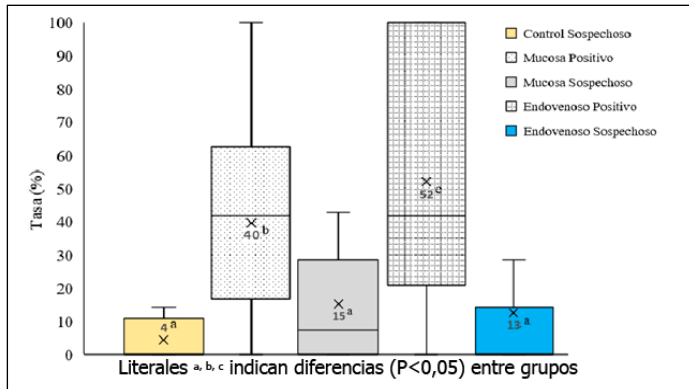


FIGURA 2. COMPORTAMIENTO DEL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE *Brucella ovis* MEDIANTE LA PRUEBA DE ELISA DE ACUERDO CON LA VÍA DE INFECCIÓN (MUCOSA O ENDOVENOSA).

Hallazgos PCR y aislamiento bacteriano

En cuanto a los resultados de PCR, en el 83% de los individuos IE no fue posible constatar la presencia de *Brucella ovis*, únicamente en el 16,6% se logró obtener la identificación ADN de *B. ovis* (FIG. 3). En lo que respecta al aislamiento bacteriológico en muestras de semen, tampoco se logró dicho aislamiento de *B. ovis* en carneros IE.

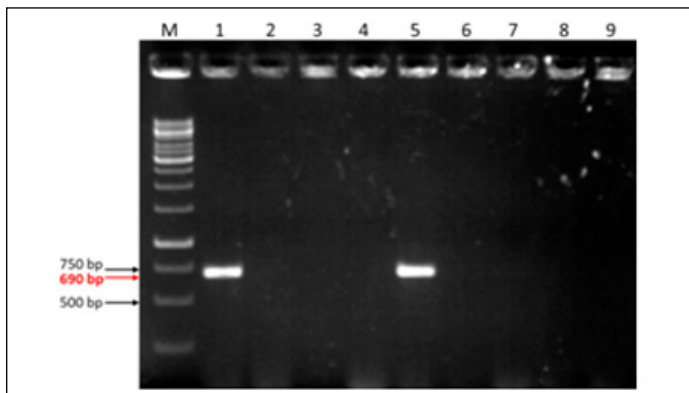


FIGURA 3. PCR PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Brucella ovis* EN SEMEN: M MARCADOR DE PESO MOLECULAR; LÍNEA 1 CONTROL POSITIVO; LÍNEA 2 CONTROL NEGATIVO; LÍNEA 5 MUESTRA POSITIVA; LINEAS 3, 4, 6, 7, 8, 9 MUESTRAS NEGATIVAS.

HALLAZGOS PATOLÓGICOS

En el 83,3% de los carneros IE (vía mucosas y endovenosa)

se encontraron lesiones macroscópicas en los genitales. Estos hallazgos fueron principalmente unilaterales e incluían la deformación e incremento de volumen y consistencia del epidídimo, así mismo se encontraron adherencias entre las envolturas testiculares. Solo se observó, en un carnero IE vía endovenosa, una lesión con contenido purulento caseoso (FIG. 4). No se observaron cambios macroscópicos en las glándulas anexas.

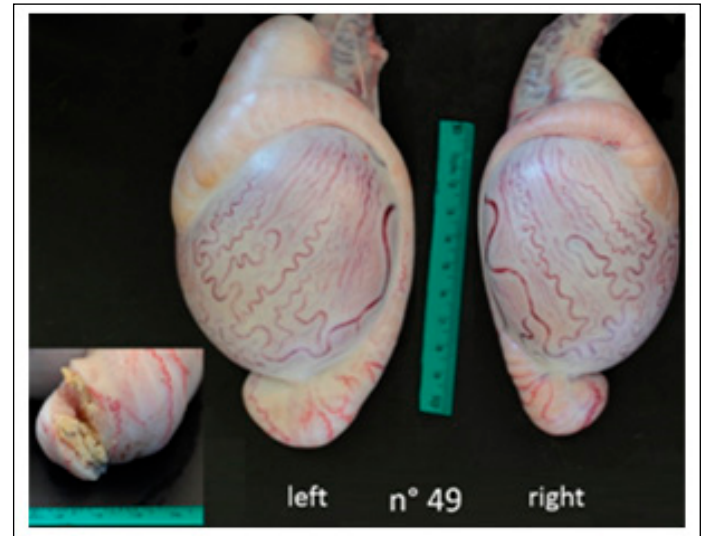


FIGURA 4. LESIONES MACROSCÓPICAS EN EL CARNERO 49, SE OBSERVA EN LA COLA DEL EPIDÍDIMO IZQUIERDO LA PRESENCIA DE EXUDADO CREMOSO E INCREMENTO DE TAMAÑO EN CABEZA, CUERPO Y COLA DEL EPIDÍDIMO.

Microscópicamente se observaron alteraciones, a nivel de epidídimo, que incluyeron: aumento del tejido fibroso intersticial, infiltrado linfoplasmocitario. Además, la mucosa del epidídimo mostró presencia de vesículas intraepiteliales, hiperplasia y metaplasia escamosa. La formación de granulomas espermáticos, solo se presentó en un animal. Por último, en las glándulas anexas se observaron, como principales cambios, infiltración linfocítica e hiperplasia del tejido glandular

Hallazgos clínicos

Los resultados de las lesiones clínicas (TABLA I) mostraron que, los carneros del grupo control no presentaron lesiones en el aparato reproductor. Para el caso de los carneros IE con *B. ovis*, (vía mucosas o endovenosa), éstos mostraron letargo, inapetencia y fiebre durante las 48 h post-IE. Además, a partir del d 6 post-IE se detectaron clínicamente cambios palpables que incluían incremento de la circunferencia y del contenido escrotal en el 66,6% del total de los carneros IE. Cambios afectaron entre el 50 y 66% de los carneros conforme trascurrieron los d post-IE hasta el término de la fase experimental; cabe destacar que los cambios detectados por palpación se localizaron principalmente en la cola del epidídimo y en forma unilateral.

Para el caso de las lesiones leves que incluyeran edema y

problemas de deslizamiento en testículos, éstas se presentaron mayormente en el testículo derecho del grupo de carneros IE vía mucosas (66,6%), mientras que, en el grupo inoculado vía endovenosa, presentó mayor porcentaje de lesiones induradas (50,0%) en el testículo derecho. Respecto al testículo izquierdo, los carneros IE vía mucosa, presentaron, edema y alteraciones en el desplazamiento testicular (50,0%) así como induraciones (50,0%), para el caso de los carneros IE vía endovenosa, las lesiones observadas en el testículo izquierdo fueron principalmente edema y alteraciones en el desplazamiento testicular (66,6%) vs lesiones induradas (33,3%) (TABLA I).

En cuanto a las lesiones a nivel de epidídimo se concentraron en la cola y la cabeza tanto derecho como izquierdo mientras que los cuerpos epididimales presentaron menor porcentaje de lesiones en los grupos con IE estas se caracterizaron por la presencia de induraciones. Por último, las lesiones mayores que incluyeron adherencias y granulomas, únicamente se encontraron en un carnero (n°49) IE vía endovenosa, dicha lesión se localizó en el epidídimo izquierdo; en la cabeza, cuerpo y cola (TABLA I).

La epididimitis infecciosa causada por *B. ovís*, es un problema que limita la productividad y eficiencia reproductiva, en consecuencia, producen pérdidas económicas en los sistemas productivos afectados. Por lo que el diagnóstico de la infección cobra relevancia; el diagnóstico de *B. ovís* puede realizarse a través de la demostración de las lesiones típicas en aparato reproductivo, pruebas serológicas y por aislamiento de *B. ovís* en laboratorio. Sin embargo, la enfermedad puede transcurrir sin lesiones aparentes por lo que se pueden encontrar animales serológicamente positivos sin lesiones clínicas [26]. Los cambios clínico-patológicos observados en este estudio son semejantes a los reportados previamente en otras investigaciones [2, 3, 15, 18], lo que refuerza la premisa de que *B. ovís* tiene predilección principalmente por órganos del aparato reproductivo de los carneros.

En esta investigación, todos los carneros infectados experimentalmente presentaron lesiones en testículos y en el epidídimo, aunque en algunos se presentaron lesiones en el testículo derecho o izquierdo o en ambos, de igual modo, las lesiones se presentaban en el epidídimo derecho o izquierdo o en ambos; en cabeza o en cola o en ambas. Y el grado de las lesiones fue desde edema y problemas de deslizamiento e induraciones hasta lesiones mayores que incluyeran adherencias y granulomas (TABLA I). Comportamiento que concuerda con otras investigaciones [5, 22] y por lo que es recomendable utilizar dos o más pruebas para el diagnóstico, de manera que se detecte un mayor número de carneros infectados.

En cuanto a la presencia de lesiones clínicas en este estudio, fue posible detectarlas a partir de d 6 post-IE; lesiones que fueron intermitentes y en algunos casos hubo carneros cuyas lesiones no remitieron durante todo el estudio, no así en algunos carneros en los cuales desaparecían esporádicamente para volver a

aparecer. Hallazgo importante, ya que bajo condiciones de campo los carneros infectados con *B. ovís* que no presentan signos de esta enfermedad son fuente de transmisión, en consecuencia, no se logra controlar la epididimitis en los rebaños [2, 15, 20, 26]. Los resultados obtenidos en esta investigación concuerdan con reportes anteriores, en donde la evaluación clínica permitía identificar carneros afectados intermitentemente, la mayoría de las lesiones son incipientes y desaparecen (FIG. 1) y reaparecen en algunos carneros con infecciones crónicas. Sin embargo, en carneros que no desarrollan tales lesiones, la infección o fue abortiva o bien transitoria [25] y posiblemente controlada por la respuesta inmune del carnero afectado (FIG. 1).

Como en otras investigaciones [27], el mayor porcentaje de carneros detectados por las pruebas serológicas se da entre los 30-60 d post-IE; en este estudio, con la prueba de ELISA, se encontraron carneros positivos desde el d 3 post-IE; independientemente de la vía de inoculación (TABLA II). Mientras que, con la prueba IGDA, la seropositividad se encontró hasta el d 13 post-IE. La prueba de ELISA ofrece una temprana detección de la enfermedad y además provee de mayor tasa de detección a los 21 d post-IE (100%) vs la prueba de IGDA, cuya máxima tasa de seropositividad (67%) la alcanza a los 70 d post-IE en carneros infectados experimentalmente vía mucosa (TABLA II).

Lo recomendable entonces es la utilización de ambas pruebas serológicas, además de la revisión clínica en los carneros [3, 19, 20]. En relación a la respuesta serológica a *B. ovís* detectada a través de la prueba de ELISA (TABLA II), se observa que a partir del d 56 post-IE, la tasa de seropositividad comienza a descender, lo que podrá representar un problema en la identificación de los animales expuestos a la infección por *Br. ovís* en los programa de control y erradicación de la epididimitis del carnero por *B. ovís* [23].

En este estudio, también se observó ($P < 0,05$), la presencia de carneros sospechosos a *B. ovís* con la prueba de ELISA (15%) (FIG. 2) los cuales se volvieron seropositivos en muestreos posteriores. Todos estos factores (inicio de la enfermedad, tipo de prueba, signos (ausencia o recurrencia), animales serológicamente sospechosos, *B. ovís* controlada por la respuesta inmune del carnero) afectan la eficacia de los programas de control y la erradicación de esta enfermedad a nivel de campo [15, 23, 29].

Las lesiones encontradas en este trabajo muestran la preferencia de la bacteria por el tejido del aparato reproductivo en los carneros, cabe destacar que una vez que la *B. ovís* cursa más de los 30 d post infección, la bacteria tiene mayor capacidad de causar lesiones dentro del aparato reproductivo y su capacidad de vivir dentro de los macrófagos, hará difícil el control de la infección por el propio organismo, tornándola así, una infección crónica, y con las afecciones en la fertilidad dentro del hato [1]. Otro problema a resolver para el diagnóstico oportuno de *B. ovís* es la dificultad para aislar o identificar esta bacteria en muestra

de semen o de tejidos, aún en aquellos carneros que resultaron con lesiones y serológicos positivos [4]; tal como sucedió en la presente investigación. Otro aspecto a considerar en el control de la enfermedad es que algunos individuos son capaces de controlar la infección o bien, la infección puede ser transitoria o abortiva [25].

CONCLUSIONES

Las vías de administración del inóculo, así como la concentración del mismo, fueron adecuadas para montar una infección experimental y lograr la seroconversión de los carneros inoculados. En este aspecto cabe destacar la capacidad de montar la infección a través de las mucosas, dado que ésta, es la vía de infección que naturalmente ocurre en los carneros.

ELISA mostró ser una prueba serológica más sensible que IGDA para el diagnóstico de carneros positivos, sin embargo IGDA es más específica, por ello es importante establecer un plan de diagnóstico que contemple la utilización de ambas pruebas con la finalidad de detectar al mayor número posible de casos positivos; lo que serviría incluso en fases incipientes de la infección. La utilización solo de la prueba de IGDA la cual es la establecida como prueba indicada por la Norma Oficial Mexicana (NOM-041-ZOO-1995) imposibilitaría la detección temprana de animales seropositivos lo que restaría eficacia a los programas de control y erradicación de la enfermedad.

La infección de *B. ovis* no muestra un patrón definido, las lesiones son intermitentes e incluso desaparecen esporádicamente para volver a aparecer. Además, no siempre es posible establecer su presencia por aislamiento bacteriológico o por PCR. Esto anticipa complicaciones en la detección temprana de *B. ovis* en rebaños infectados. Los programas de control y erradicación deberán incluir revisiones clínicas, pruebas serológicas IGDA utilizada como prueba tamiz y pruebas de ELISA cuando los programas de control se encuentren en etapas avanzadas de desarrollo.

Es importante seguir desarrollando estudios que permitan conocer más la interrelación de *B. ovis*-hospedador-inmunidad para establecer estrategias que permitan tener mayor certeza en el diagnóstico, independientemente del tiempo en que se contrae dicha enfermedad.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Programa de Consolidación Institucional de Grupos de investigación: Retención Ref: 09-01.117071 y al PROMEP por el proyecto PROMEP/103.5/10/4368. Al CNID-Microbiología INIFAP por la donación de la cepa utilizada como inóculo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ANTUNES, J. M.A. P.; ALLENDORF, S. D.; APPOLINARIO, C. M.; CAGNINI, D. Q.; FIGUEIREDO, P. R.; JUNIOR, J. B.; BAÑOS, J. V.; KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; MEGID, J. Rough virulent strain of *Brucella ovis* induces pro-and anti-inflammatory cytokines in reproductive tissues in experimentally infected rams. **Vet. Microbiol.** 161: 339-343. 2013.
- [2] CARVALHO, C. A. Jr.; MOUSTACAS, V. S.; XAVIER, M. N.; COSTA, E. A.; COSTA, L. F.; SILVA, T. M.M A.; PAIXÃO, T. A.; BORGES, A. M.; GOUVEIA, A. M. G.; SANTOS, R. L. Andrological, pathologic, morphometric, and ultrasonographic findings in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. **Small Rumin. Res.** 102 (2-3): 213-222. 2012.
- [3] COSTA, L. F.; NOZAKI, C. N.; LIRA, N. S. C.; ANTUNES, J. M. A. P.; XAVIER, M. N.; COSTA, E. A.; PAIXÃO, T. A.; SANTOS, R. L.; MEGIDI, J. Species-specific nested PCR as a diagnostic tool for *Brucella ovis* infection in rams. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.** 65(1): 55-60. 2013.
- [4] COSTA, E. A.; SANT'ANA, F. M.; CARVALHO, C. J. S.; MOUSTACAS, V. S.; SILVA, S. M. M. S.; PAIXÃO, T. A.; SANTOS, R. L. Diagnosis of *Brucella ovis* infection by serology and PCR in urine samples from naturally infected rams in the State of Piauí. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.** 64 (3): 751-754. 2012.
- [5] COX, J. C.; GORRIE, C. J.; NAIRN, R.C.; WARD, H. A. A comparison of methods for the serological diagnosis of *Brucella ovis* infection. **Br. Vet. J.** 133(5): 442-5. 1977.
- [6] DIAZ, A. G.; CLAUSSE, M.; PAOLICCHI, F. A.; FIORENTINO, M. A.; GHERSI, G.; ZYLBERMAN, V.; GOLDBAUM, F. A.; ESTEIN, S. M. Immune response and serum bactericidal activity against *Brucella ovis* elicited using a short immunization Schedule with the polymeric antigen BLSOmp31 in rams. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 154: 36-41. 2013.
- [7] DÍAZ-APARICIO, E.; TENORIO-GUTIERREZ, V. R.; ARELLANO-REYNOSO, B.; ENRIQUEZ-VERDUGO, I.; AGUILAR-ROMERO, F. Pathogenicity of different strains of *Histophilus somni* in the experimental induction of ovine epididymitis. **Can. J. Vet. Res.** 73: 157-160. 2009.
- [8] FARAWAY, J.J. Generalized Linear Models. In: **Texts in Statistical Science**. Extending the linear model with R generalized linear, mixed effects and nonparametric regression models. Chapman Hall/CRC Taylor & Francis Group, Boca Raton, EUA. Pp 126-148. 2006.
- [9] GALINDO, R. C.; MUÑOZ, P. M.; DE MIGUEL, M. J.; MARIN, C. M.; BLASCO, J. M.; GORTAZAR, C.; KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J. Differential expression of inflammatory and immune response genes in rams experimentally infected

- with a rough virulent strain of *Brucella ovis*. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 127: 295-303. 2009.
- [10] HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. Espermatozoides y plasma seminal. In: **Reproducción e inseminación de los animales**. Mc Graw Hill. México. Pp 98-112. 2002.
- [11] INSTITUTE FOR INTERNATIONAL COOPERATION IN ANIMAL BIOLOGIS. Epididimitis ovina: *Brucella ovis*. 2009. The center for Food Security and Public Health. Iowa State University. College of Veterinary Medicine. On Line: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/brucella_ovis-es.pdf. 29/07/2009.
- [12] LITTELL, R.C., HENRY, P.R., AMMERMAN, C.B. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. **J. Anim. Sci.** 76: 1216-1231. 1998.
- [13] MANTEROLA, L.; TEJERO-GARCES, A.; FICAPAL, A.; SHOPAYEVA, G.; BLSACO, J. M.; MARIN, C. M.; LOPEZ-GOÑI, I. Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in semen samples from rams. **Vet. Microbiol.** 92: 65-72. 2003.
- [14] MILES, A. A.; MISRA, S. S.; IRWIN, J. O. The estimation of the bactericidal power of the blood. **J. Hyg.** 38: 732-49. 1938.
- [15] NOZAKI, C. N.; CAVALCANTI DE L, NS; FILHO, O. A.; AZEVEDO, H. C.; RODELLO, L.; DASSO, M. G.; BICUDO, S. D.; ANTUNES J. M. A. P.; MEGID, J. Rapid serum agglutination and agar gel immunodiffusion test associated to clinical signs in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. **Cien. Rural.** 41(8): 1441-1446. 2011.
- [16] OUAHRANI-BETTACHE, S.; SOUBRIER, M.P.; LIAUTARD, J.P. IS6501-anchored PCR for the detection and identification of *Brucella* species and strains. **J. Appl. Bacteriol.** 81 (2): 154-60. 1996.
- [17] PAOLICCHI, F. A.; NUNEZ, M.; FIORENTINO, M. A.; MALENA, R. C.; TRANGONI, M.; CRAVERO, S.; ESTEIN, S. M. Respuesta humoral y consecuencias reproductivas en ovejas desafiadas con *Brucella ovis* al final de la gestación. **Rev. Argent. Microbiol.** 45: 13- 20. 2013.
- [18] PAOLICCHI, F. A.; CASARO, P. A.; GIMENO, E. J.; KORTEBANI, L. G.; MAZZOLLI, A. B. Antisperm response in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. **Small Rum. Res.** 36: 7-15. 2000.
- [19] PICARD-HAGEN, N.; BERTHELOT, X.; CHAMPION, J. L.; EON, L.; LYAZRHI, F.; MAROIS, M.; PEGLION, M.; SCHUSTER, A.; TROUCHE, C.; GARIN-BASTUJI, B. Contagious epididymitis due to *Brucella ovis*: relationship between sexual function, serology and bacterial shedding in semen. **BMC Vet. Res.** 11: 125. 2015.
- [20] RIDLER, A. L.; SMITH, S. L.; WEST, D. M. Seroconversion and semen shedding in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. **N. Z. Vet. J.** 62 (1): 47-50. 2014.
- [21] SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA Y DESARROLLO RURAL (SAGARPA). Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995. Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres. Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO- 1995. 01/22/1997. Diario Oficial de la Federación. México. Pp 2-6. 1997.
- [22] WEBB, R.F.; QUINN, C.A.; COCKRAM, F.A.; HUSBAND, A.J. Evaluation of procedures for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. **Aust. Vet. J.** 56 (4): 172-5. 1980.
- [23] WEST, D.M.; BRUCE, R.A. Observation on the eradication of *Brucella ovis* infection from a ram flock. **N. Z. Vet. J.** 39 (1): 29-31. 1991.
- [24] WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. (OIE). Code sanitary for Terrestrial Animals. 2008. Manual of diagnostic tests and vaccines. Epididimitis ovina. Paris: OIE. En línea: <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-terrestre/acceso-en-linea/> 18/02/2014.
- [25] WORTHINGTON, R.W.; STEVENSON, B.J.; DE LISLE, G.W. Serology and semen culture for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in chronically infected rams. **N. Z. Vet. J.** 33 (6): 84-6. 1985.
- [26] WORTHINGTON, R.W. The complement fixation test for *Brucella ovis*. **N. Z. Vet. J.** 30(10): 159-60. 1982.
- [27] XAVIER, M. N.; SANT´ANNA, F. M.; SILVA, T. M. A.; COSTA, E. A.; MOUSTACAS, V. S.; MERLO, F. A.; CARVALHO, C. A. Jr.; DASSO. M. G.; MATHIAS, L. A.; GOUVEIA, A. M. G.; LAGE, A. P.; SANTOS, R. L. A comparison of two agar gel immunodiffusion methods and a complement fixation test for serologic diagnosis of *Brucella ovis* infection in experimentally infected rams. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.** 63(4): 1016-1021. 2011.
- [28] XAVIER, M. N.; SILVA, T. M. A.; COSTA, E. A.; PAIXÃO, T. A.; MOUSTACAS, V. S.; CARVALHO, C. A. Jr.; SANT´ANNA, F. M.; ROBLES, C. A.; GOUVEIA, A. M. G.; LAGE, A. P.; TSOLIS, R. M.; SANTOS, R. L. Development and evaluation of a species-specific PCR assay for the detection of *Brucella ovis* infection in rams. **Vet. Microbiol.** 145: 158-164. 2010.
- [29] SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERÍA Y DESARROLLO RURAL (SAGARPA). Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales. 04-04-18. En línea: <https://www.gob.mx/senasica/documentos/norma-oficial-mexicana-nom-041-zoo-1995-campana-nacional-contra-la-brucelosis-en-los-animales>. 04/04/2018.



REVISTA CIENTÍFICA

Vol, XXVIII, N° 3 _____

*Esta revista fue editada en formato digital y publicada en
Junio de 2018, por La Facultad de Ciencias Veterinarias,
Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela.*