

# Epidimitis ovina: Estudios bacteriológico y serológico

Graciela Méndez Nárez\*  
Efrén Díaz Aparicio\*, \*\*  
José Francisco Morales Álvarez\*  
Francisco Aguilar Romero\*, \*\*  
Francisco Suárez Güemes\*\*

---

## Abstract

Brucellosis in ovine is due to *Brucella ovis*, *B. melitensis*, and *B. abortus*. In male sheep these bacteria might induce epididymitis and orchitis, and in female the disease is present and might induce abortion in late gestation. There are some other bacteria such as *Actinobacillus seminis* and *Histophilus ovis* which may cause the same clinical signs. The goal of this research was to establish the frequency of isolation of *B. ovis* and/or *A. seminis* in male sheep with clinical diagnosis of epididymitis. Six different flocks from the states of Mexico, Hidalgo and México City were used in the study. Serum samples from 111 males, Semen and/or testis samples from 17 rams were collected. The clinical diagnosis was established by direct observation and palpation. The serologic tests used were: the card test (3% cc) for *B. melitensis* and *B. abortus*. For *B. ovis* an indirect ELISA and double immunodiffusion (IDD) tests were performed, the antigen used was a hot saline extraction. For *A. seminis* the IDD test with a soluble antigen was used. This antigen was obtained by sonication. Bacteriological studies were performed on semen and tissue samples. Isolated bacteriae were identified according to routine techniques. The disease was diagnosed in all the 6 flocks studied. There were 10 (9.0%) positive animals to *B. ovis* by the IDD test. With the indirect ELISA 25 (22.5%) sera were positive. Serological results for smooth *Brucella* were 20 (18%) positive. Three out of the 6 flocks were positive to *A. seminis* from those 10 (9.0%) sera were positive to IDD. Bacteriological studies resulted in the isolation of *B. ovis* from testis in two occasions, and two isolates of *A. seminis* from semen samples.

**KEY WORDS:** OVINE, EPIDIDYMITS, *BRUCELLA OVIS*, *ACTINOBACILLUS SEMINIS*, SEROLOGIC STUDIES.

## Resumen

La brucellosis en ovinos puede ser causada por *Brucella ovis* y por brucelas lisas, en ambos casos puede presentarse epididimitis u orquitis, las cuales también se asocian con otros agentes infecciosos como *Actinobacillus seminis* e *Histophilus ovis*. El objetivo de este trabajo fue aislar e identificar los agentes bacterianos involucrados en la epididimitis ovina y establecer la relación en el diagnóstico serológico y bacteriológico de brucelas lisas, de *B. ovis* y *A. seminis* con la presencia de epididimitis clínica. Se trabajó en 6 rebaños ovinos localizados en los estados de México, Hidalgo y el Distrito Federal, se tomaron muestras de suero de 111 machos, y muestras de semen y testículos de 17 carneros. La presencia de epididimitis se determinó por palpación y observación. A los sueros se les aplicó la prueba diagnóstica de tarjeta al 3% para brucelas lisas, las pruebas de ELISA indirecta e inmunodifusión doble (IDD) con el antígeno proteínico de extracción salina caliente para *B. ovis*, e IDD con antígeno soluble para *A. seminis*. Se realizó análisis bacteriológico a las muestras de semen y testículos de machos con epididimitis, a las cepas aisladas se les efectuaron pruebas de identificación bioquímica rutinarias; para *A. seminis* se realizó además IDD con antígeno obtenido por lisis de cepas aisladas y de referencia. En los 6 rebaños se diagnosticó la presencia de anticuerpos para *B. ovis*, por IDD, se encontraron 10 positivos (9.0%), en ELISA indirecta se obtuvieron 25 sueros positivos (22.5%), para brucelas lisas se encontraron 20 sueros positivos (18.01%). Para *A. seminis* se identificaron 10 sueros positivos (9.0%), pertenecientes a 3 de los 6 rebaños muestreados. Se lograron aislar dos cepas de *B. ovis* a partir de testículos, y dos cepas de *A. seminis* de semen.

**PALABRAS CLAVE:** OVINOS, EPIDIDIMITIS, *BRUCELLA OVIS*, *ACTINOBACILLUS SEMINIS*, PRUEBAS SEROLOGICAS.

---

Este trabajo forma parte de la tesis de licenciatura del primer autor.

\*Laboratorio de Bacteriología, Centro Nacional de Investigaciones en Microbiología Veterinaria, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Carretera México-Toluca, Km 15.5, C.P. 05110, México, D.F.

\*\*Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. 04510, México, D.F.

## Introducción

La población ovina nacional en 1999 es de alrededor de seis millones de borregos y el 55% de la población está concentrada en el centro del país. Como presión de la elevada demanda, se ha recurrido a la importación, la cual ha superado el 50% del abasto nacional. El riesgo de introducción de enfermedades por la importación de ganado para abasto, prevalece, ya que con frecuencia algunos lotes son desviados en su trayecto hacia fines de cría, diseminando así enfermedades infecciosas, como fue el caso de *Brucella ovis*, cuyo primer aislamiento en México fue a partir de animales importados de los Estados Unidos de América.<sup>1</sup>

La brucellosis ovina es producida por *Brucella melitensis*, que es una bacteria lisa, y *B. ovis*, la cual se caracteriza por ser rugosa. Aunque ambas especies pueden producir abortos y alteraciones testiculares, *B. ovis* parece afectar en forma especial al carnero y sus tejidos, en el que produce un cuadro característico que se denomina epididimitis infecciosa; no hay informes de que esta bacteria afecte al humano.<sup>2</sup>

El primer informe sobre *B. ovis* en México fue en 1974 cuando se encontró serología positiva en 2.6% de un total de 380 sueros obtenidos de borregos Tabasco. No fue sino hasta 1979 en que se logró aislar *B. ovis* de sementales Suffolk en el estado de Guanajuato. Los datos referentes a la infección de ovinos por brucellosis en México son escasos.<sup>3</sup>

*B. ovis* se asocia a epididimitis en los carneros adultos, utilizados como sementales, mientras que a la epididimitis en corderos que no han sido usados como sementales, se asocian microorganismos como *Actinobacillus seminis* e *Histophilus ovis*, aunque estos mismos también se han aislado de carneros adultos.<sup>4,5</sup>

Las bacterias *A. seminis* e *H. ovis* son consideradas como parte de la microbiota permanente o transitoria de las mucosas del tracto reproductor de los corderos, y son oportunistas. Causan infecciones ascendentes al epidídimo y ocasionalmente al testículo y órganos sexuales accesorios; sin embargo, los factores específicos que predisponen a estos órganos a la infección no se han definido claramente. Estos microorganismos también pueden verse involucrados en cuadros de artritis, laminitis, meningitis y septicemia<sup>6</sup>. Otros microorganismos como *Actinomyces pyogenes*, *Bacteroides* sp, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Haemophilus* sp, *Escherichia coli*, *Pasteurella* sp, *Staphylococcus* sp y *Streptococcus* sp pueden ser aislados del epidídimo, e inducir lesiones en él y en el testículo; estas lesiones que no son diferenciables por palpación y cuadro clínico.<sup>6</sup>

El signo clínico más frecuente de la epididimitis infecciosa es el aumento de tamaño, generalmente unilateral, del epidídimo, algunos animales infectados no presentan alteraciones testiculares detectables mediante palpación, por lo que es necesario recurrir a pruebas serológicas y bacteriológicas para establecer un diagnóstico preciso.<sup>7</sup>

Las hembras rara vez son afectadas por *B. ovis*, pudiéndose presentar aborto; sin embargo, su importancia epidemiológica radica en que pueden diseminar la enfermedad a sus crías.<sup>2</sup>

El diagnóstico serológico se realiza con base en la demostración de la presencia de anticuerpos frente a antígenos de *B. ovis*. Las pruebas recomendadas son: Fijación del complemento (FC), inmunodifusión doble en agar (IDD) y ELISA indirecto con antígeno del extracto salino calentado (ESC).<sup>7</sup>

El aislamiento de los agentes etiológicos constituye el diagnóstico definitivo; las muestras adecuadas son: semen, testículos y epididímos. En la borrega, el aislamiento se intenta de exudados vaginales, placenta, o de los fetos abortados (hígado, bazo, pulmón y contenido abomasal).<sup>2,8</sup>

Los objetivos de este trabajo fueron: realizar el aislamiento e identificación de los diferentes agentes etiológicos que están involucrados en la epididimitis infecciosa en carneros, establecer la relación en el diagnóstico serológico y el bacteriológico de brucelas lisas, de *B. ovis* y *A. seminis*, con la presencia de epididimitis clínica.

## Material y Métodos

Se seleccionaron 6 explotaciones de ovinos bajo dos criterios: la presencia de animales con epididimitis clínica, y positivos en serología a *B. ovis*, mediante la técnica de IDD. Las características de las explotaciones están detalladas en el Cuadro 1.

En cada una de las explotaciones se realizó un examen clínico a los sementales. Así mismo, se procedió a la extracción de muestras de suero y semen de cada uno de ellos. El examen clínico de testículos se realizó por observación y palpación, considerando la simetría testicular y el deslizamiento de los testículos en la bolsa escrotal, para determinar la presencia de adherencias de las túnicas vaginales, además de la consistencia y tamaño del epidídimo.

Las castraciones de machos con trastornos testiculares se realizaron cuando el productor lo permitió. El número de machos y sementales muestrados por rancho, así como el rango de edad se muestran en el Cuadro 2.

## Muestras de semen y tejidos

El semen se obtuvo utilizando una vagina artificial o un electroeyaculador, previo lavado del prepucio con agua y jabón. El semen se colectó en bolsas estériles de plástico mantenidas en refrigeración a 4°C hasta realizar la inoculación en medios de cultivo, en un lapso no mayor de 6 horas.

Los testículos obtenidos de las castraciones se colocaron en bolsas de plástico y se mantuvieron en refrigeración a 4°C, para procesarlos el mismo día y realizar los cultivos bacteriológicos.

**Cuadro 1**
**DESCRIPCION DE LOS SEIS REBAÑOS DONDE SE REALIZO EL ESTUDIO BACTERIOLOGICO Y SEROLOGICO DE OVINOS CON Y SIN EPIDIDIMITIS.**

<b>Rebaño</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
Ubicación	Apan, Hidalgo	Topilejo, Distrito Federal	Chalma, Estado de México.	Cuautitlán, Estado de México	Tulancingo, Hidalgo	Tulancingo, Hidalgo
Especies en el rancho	Ovinos	Bovinos Ovinos Caprinos	Ovinos	Ovinos Bovinos Caprinos Equinos	Ovinos	Ovinos Bovinos
Raza	Suffolk Romanov	Pelibuey Suffolk	Pelibuey	Pelibuey Suffolk Columbia Rambouillet.	Hampshire Suffolk	Hampshire Suffolk
Fin zootécnico	Engorda	Docencia	Engorda y recría	Docencia.	Pie de cría	Venta de sementales

**Cuadro 2**
**NUMERO TOTAL DE OVINOS POR REBAÑO Y NUMERO DE ANIMALES MUESTREADOS PARA EL ESTUDIO SEROLÓGICO DE OVINOS CON Y SIN EPIDIDIMITIS**

<b>Rebaño</b>	<b>Total de animales</b>	<b>Machos muestreados</b>	<b>Rango de edad (años)</b>	<b>Número de Sementales</b>
1	14	4	2 a 4	4
2	270	8	2 a 6	8
3	460	58	0.5 a 3	6
4	117	8	2 a 4	8
5	273	23	0.3 a 4	2
6	260	10	1 a mas de 4	10
Total	1394	111		38

### ***Histopatología***

Se tomaron secciones de tejidos del epidídimo (cabeza, cuerpo y cola), así como de testículo. Estas muestras se fijaron en solución de Bouin<sup>9</sup> durante 24 horas, y al término de este periodo se lavaron con agua destilada y se conservaron en alcohol al 70% hasta su procesamiento. Los tejidos se procesaron para el estudio histopatológico y se tiñeron con la técnica de hematoxilina-eosina.<sup>9</sup>

### ***Obtención de antígenos***

Se realizó la obtención del extracto salino calentado (ESC), utilizando la cepa de referencia *B. ovis* Reo 198, y se siguió la técnica descrita por Myers.<sup>10</sup>

En la preparación del antígeno soluble de *A. seminis*, para la detección de anticuerpos séricos, se utilizó la cepa de referencia 15768 de *A. seminis*, obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC), la cual se sembró en agar sangre a 37°C de 24 a 48 horas con 10% de CO<sub>2</sub>, para después cosechar en solución salina fisiológica (SSF) estéril y ajustar la concentración

celular en el espectrometro a una densidad óptica de 4.0 a 540 nm. La suspensión se incubó a 4°C por 24 horas y después se centrifugó a 1000 g durante 15 minutos, el sobrenadante constituyó el antígeno.<sup>11</sup>

El antígeno lisado se obtuvo a partir de las cepas aisladas que bioquímicamente sugerían ser *A. seminis* y la de referencia 15768 de *A. seminis*, las cuales se sembraron en agar sangre e incubaron en 10% de CO<sub>2</sub> de 18 a 24 horas a 37°C. Las bacterias obtenidas se cosecharon en 10 ml de SSF y se congelaron a -60°C durante 48 horas. Una vez descongelado el contenido celular se lisó por tres tiempos (60%, 80% y 100% del poder del lisador de células) de un minuto con intervalos de 15 minutos de reposo, después se procedió a centrifugar a 1000 g por 10 minutos, para obtener el sobrenadante que constituía el antígeno.<sup>12</sup>

### ***Obtención de sueros hiperinmunes para la identificación de cepas***

Para obtener los sueros hiperinmunes usados como testigos en la identificación de *A. seminis*, se inocularon por vía endovenosa, dos conejos con la cepa de referencia

a una concentración celular con densidad óptica de 0.674 a una longitud de onda de 540 nm en el espectrómetro y otros dos conejos con *B. ovis* con una concentración celular con densidad óptica de 0.284 a una longitud de onda de 600 nm. La inactivación de las bacterias se realizó con formol al 0.1 %.<sup>11</sup> La especificidad del suero hiperinmune se probó con el antígeno soluble y el antígeno obtenido por lisis celular, al realizar la prueba de IDD para *A. seminis* se observaron líneas claras de identidad entre los antígenos y el suero homólogo. También se trabajaron como testigo y de manera simultánea, antígenos obtenidos a partir de otras bacterias relacionadas antigenéticamente como *Haemophilus somnus* y *Pasteurella haemolytica*

## Pruebas serológicas

### Inmunodifusión doble en agar (IDD) para *B. ovis* y *A. Seminis*

Esta prueba se realizó mediante la técnica de Ouchterlony<sup>13</sup>, utilizando portaobjetos como soporte. El gel para *B. ovis* se preparó con agarosa al 1.1 % en solución amortiguadora de borato (pH 8.3), con un 10 % de NaCl. La roseta utilizada estaba formada por 6 pocillos periféricos y uno central de 6 mm de diámetro con una separación entre ellos de 3 mm; en el pocillo del centro se colocó el antígeno ESC, en un pocillo de la periferia se colocó el suero testigo positivo y en los demás los sueros problema.

Para *A. seminis* se realizó la misma técnica pero utilizando el antígeno soluble, un suero hiperinmune como testigo positivo y un gel al 0.5% de agarosa y 0.1 % de azida de sodio con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) a un pH de 7.2. En cada uno de los pocillos restantes se colocaron 16 µl de los sueros problema y se incubaron a 4 C, para posteriormente realizar la lectura a las 72 horas. Los sueros problema se consideraban positivos cuando había una línea de identidad con la línea producida por el suero testigo positivo.

### ELISA indirecto con antígeno ESC para *B. ovis*

Se realizó en microplacas de poliestireno Maxisorp (Nunc Inc.). El ESC se utilizó a una concentración de 5 mg/ml en solución amortiguadora de boratos. Tras una titulación previa, el antígeno se pegó a las placas añadiendo a los pocillos 100 µl de la solución con antígeno, y se incubó una noche a 37°C. Las placas fueron selladas con plástico para evitar la evaporación. El antígeno no adsorbido se retiró mediante 3 lavados con PBS (0.01 M, pH 7.2) más 0.05 % de Tween 20, la técnica se realizó como lo describen trabajos anteriores.<sup>7, 14, 15</sup>

Para estandarizar los resultados, se tomó como referencia la densidad óptica obtenida para una sola dilución, con uno de los sueros testigo positivo, elegido al azar. Todas las densidades ópticas de los demás animales se convirtieron en porcentajes de ese valor. La dilución utilizada fue de 1:200 y el punto de corte se tomó del valor obtenido en un estudio realizado previamente,<sup>14</sup> obtenido bajo condiciones similares y del cual se obtuvo una sensibilidad del 100% y una especificidad del 84%.

## Prueba de rosa de Bengala (RB)

Se realizó en placas de plástico, depositando 0.03 ml de antígeno y 0.09 ml de suero y agitando suavemente durante 4 minutos; aunque el antígeno utilizado\* fue preparado a una concentración celular del 8%, con los volúmenes utilizados se obtiene una concentración final de aproximadamente 3%, haciendo la prueba más sensible<sup>15</sup>. Esta prueba se utilizó para la detección de anticuerpos contra brucelas lisas.

## Métodos bacteriológicos

Las muestras de semen y tejidos para el aislamiento de *B. ovis* se sembraron en medio de Thayer-Martin modificado. Las muestras de tejido se tomaron del epidídimo y del testículo, y se maceraron con SSF estéril, posteriormente se sembraron e incubaron a 37°C con 10% de CO<sub>2</sub> entre 6 a 7 días. Con el fin de aislar otros posibles agentes bacteriológicos de la epididimitis, las mismas muestras se sembraron en agar sangre y agar chocolate modificado<sup>16</sup>; se incubaron entre 18 a 24 horas a 37°C en condiciones atmosféricas de 5% a 10% de CO<sub>2</sub> y anaerobiosis.<sup>17</sup>

Para la identificación de las colonias sospechosas de *B. ovis* se realizó una tinción de Gram y posteriormente se llevaron a cabo las pruebas bioquímicas primarias y secundarias, como: oxidasa, catalasa, urea, TSI, SIM y aglutinación con acriflavina.<sup>18</sup>

A las colonias sospechosas de *A. seminis* se les realizó tinción de Gram y después se identificaron mediante las pruebas bioquímicas: urea, indol, leche tornasolada y de acidificación de azúcares, como arabinosa, fructuosa y trealosa.

## Identificación de cepas

Se preparó antígeno, obtenido por lisis celular, de cada cepa sospechosa de *A. seminis*, para ser enfrentado a un suero hiperinmune producido con la cepa de referencia 15768, utilizando la prueba de IDD, teniendo como testigo positivo, antígeno obtenido por lisis de la cepa de referencia.

## Resultados

A la inspección clínica, 10 carneros (9.0% de 111 animales) evaluados presentaron alteraciones testiculares,

\*Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (Pronabive)

la afección se presentó principalmente en animales de 3 a 4 años. Estos animales pertenecían a 4 de los 6 ranchos muestreados. Las lesiones encontradas a la palpación fueron un aumento de tamaño de testículos y epidídimo de aproximadamente dos veces lo normal, que presentaba una consistencia dura y se detectó la presencia de adherencias en túnicas vaginales.

El antígeno de ESC para la prueba de IDD y ELISA indirecta, contenía de 45% a 65% de proteínas, mayoritariamente del grupo 3 de membrana externa, y 0.3%-1.5 % de ácido 2-ceto, 3-deoxioctulosónico (KDO), correspondiente a entre 10% a 55 % de lipopolisacárido rugoso.

A la prueba de IDD para *B. ovis* fueron positivos 10 sueros (9.0%), de un total de 111 animales muestreados, pertenecientes a 5 de las 6 explotaciones; el único rancho que resultó negativo fue la explotación número 6 ubicada en Tulancingo, Hidalgo, México (Cuadro 3).

De los 111 sueros probados por la prueba de ELISA indirecta para *B. ovis*, 25 (22.5%) resultaron positivos. En todos los ranchos por lo menos un animal resultó positivo (Cuadro 3). En la prueba de IDD para *A. seminis* se encontraron 10 (9.0%) animales positivos, que pertenecían a 3 de las 6 explotaciones muestreadas; los ranchos negativos fueron el 2, 4 y 6, este último de Tulancingo, Hidalgo, que resultó negativo en el caso de la IDD para *B. ovis*, (Cuadro 3).

En la prueba de RB se obtuvieron 20 (18.01%) ovinos positivos a brucelas lisas, pertenecientes a 4 de los 6 ranchos muestreados. La explotación 1 de Apan, Hidalgo, México, y la explotación 3 de Chalma, Estado de México, México, resultaron negativas (Cuadro 3).

En el estudio bacteriológico de semen, de las 14 muestras trabajadas se obtuvieron dos aislamientos de *A. seminis*, y con respecto a las 5 muestras de tejidos, se aislaron

dos cepas de *B. ovis* a partir de epidídimo (Cuadro 3). Las lesiones macroscópicas observadas en los testículos donde se aisló *B. ovis* fueron: aumento de tamaño del epidídimo y del testículo, con asimetría unilateral; a la palpación se denotaba la presencia de adherencias y engrosamiento de las túnicas vaginales. Al corte se observó salida de exudado amarillento, de consistencia cremosa, y al examen histológico se observó la presencia de granulomas localizados en testículo y epidídimo en sus tres porciones, presencia de quistes intraepiteliales, esclerosis de vasos sanguíneos e infiltrado de células mononucleares.

Como puede observarse en las pruebas serológicas, para *B. ovis* resultaron 35 (31.53%) ovinos positivos, 25 (22.5%) no presentaban alteraciones testiculares aparentes y 10 (9.0%) de ellos tenían una orquitis o epididimitis diagnosticada al estudio clínico.

De los 10 carneros positivos en serología a *A. seminis*, sólo 2 (1.8%) presentaron orquitis y epididimitis clínica, además también resultaron positivos a *B. ovis* en las pruebas serológicas.

Los dos aislamientos bacteriológicos de *B. ovis* correspondieron a carneros de raza Pelibuey y Suffolk, que eran seropositivos a las pruebas de ELISA indirecta e IDD para *B. ovis* y a IDD para *A. seminis*, pero sólo uno de ellos presentaba alteraciones testiculares. Los dos aislamientos de *A. seminis* también fueron de carneros de raza Pelibuey que presentaban alteraciones testiculares, pero serológicamente negativos a *A. seminis*, y uno de ellos fue seropositivo sólo a la prueba de ELISA indirecta para *B. ovis*. Los resultados serológicos obtenidos de los machos de diferentes edades muestran que hay seropositivos a *B. ovis* y *A. seminis* con las pruebas de IDD y ELISA, indirecta desde los 4 meses hasta los 5 años de edad.

Cuadro 3

**RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS SEROLOGICO, BACTERIOLOGICO Y CLINICO PARA EL DIAGNOSTICO DE EPIDIDIMITIS CAUSADA POR *B. ovis*, BRUCELAS LISAS Y *A. seminis* EN OVINOS DE 6 REBAÑOS**

Rebaño	Sexo	Número de Animales muestreados	Brucella ovis IDD ELISA (positivos)	Brucelas lisas (positivos)	<i>A. seminis</i> IDD (positivos)	Presencia de epididimitis Clínica	Aislamientos de <i>B. ovis</i> <i>A. seminis</i>
1	M	4	1	4	0	2	0
2	M	8	1	3	4	0	4
3	M	58	5	8	0	4	2
4	M	8	1	2	1	0	0
5	M	23	2	6	5	4	2
6	M	10	0	2	1	0	2
Total	M	111	10 (9%)	25(22.5%)	20 (18.01%)	10 (9%)	10 (9%)

IDD: Inmunodifusión doble

M : Machos

## Discusión

La prueba de IDD con antígeno ESC utilizada en el presente trabajo ha sido considerada como adecuada por diversos autores para el diagnóstico de la epididimitis causada por *B. ovis*.<sup>10,19-21</sup> Marín *et al.*<sup>20</sup> estudiaron 83 animales con infección comprobada por bacteriología, encontrando 81 positivos a ELISA indirecta, 80 a IDD y 77 en FC. Scanlan<sup>6</sup> en otro estudio comparativo obtuvo una sensibilidad del 96.4% en IDD, 92.7% en FC y 97.6% en ELISA indirecta, con una especificidad del 100% en todas; además, al realizar la combinación de dos pruebas como ELISA indirecta e IDD, se obtuvo la sensibilidad del 100%, por estas razones se recomienda utilizar ambas pruebas en combinación, para el diagnóstico de *B. ovis*.

Por lo tanto, la prueba tamiz recomendada para el diagnóstico de la epididimitis infecciosa producida por *B. ovis* es la IDD.<sup>22</sup> La prueba anterior puede complementarse con la ELISA indirecta, aunque esto implica un costo mayor en el diagnóstico.

Es importante mencionar que para la realización de estas pruebas se debe utilizar el antígeno ESC ya que es el que proporciona mejor sensibilidad y especificidad que los realizados a partir de LPS rugoso libre de proteínas, y los obtenidos por lisis bacteriana para el diagnóstico de *B. ovis*.<sup>2</sup>

Aunque por su sencillez, la IDD resulta la prueba más recomendable, hay que hacer notar que el uso del ESC en esta prueba no está exento de problemas; el más importante es la estabilidad del antígeno, la cual después de rehidratado, disminuye paulatinamente su título.<sup>23</sup> En este trabajo se observó que el antígeno, al ser congelado y descongelado, perdía la capacidad de dar una línea clara de precipitación con el suero testigo positivo, este hecho se presentó a partir del tercer proceso de congelación-descongelación.

La presentación de la enfermedad determinada por la edad ha sido muy discutida.<sup>5</sup> En el presente trabajo se encontró que había corderos seropositivos a ambas pruebas diagnósticas de *B. ovis*, desde los cuatro meses de edad, aunque en menor proporción que en los adultos. En forma general se considera que la enfermedad es más común en animales adultos debido a los mecanismos de transmisión que incluyen, como principal, la directa carnero a carnero, y otras menos relevantes como la vía oral y la venérea o pasiva, a través de la oveja. En otro estudio se encontró la enfermedad en ovinos jóvenes que nunca habían cubierto, sugiriendo que éstos son más susceptibles.<sup>24</sup> En el presente estudio, el rebaño donde se encontraron animales jóvenes positivos, se observó que éstos eran sometidos a dominancia, que incluía la sodomía, por los animales adultos, por lo que se piensa que ésta fue la vía de contagio. Sin embargo, si se acepta la genital como principal vía de infección, la mayor parte de los autores coincide en que los adultos estarían más expuestos, y que con la edad aumenta el índice de alteraciones testiculares asociadas a *B. ovis*.<sup>7,8,25</sup>

La seropositividad en corderos podría también explicarse

por la transmisión a partir de la oveja, a pesar de que a las hembras se les ha dado un papel poco importante en la epidemiología de la enfermedad<sup>26</sup>. Datos obtenidos en un trabajo colateral, donde se tomaron sueros de borregas y se probaron contra *B. ovis* por medio de la prueba de ELISA, mostraron un menor número de hembras seropositivas que de machos; sin embargo, en estudios recientes se ha demostrado que hembras gestantes inoculadas con *B. ovis* tuvieron aborto en el último tercio de gestación, con eliminación de *B. ovis* en leche durante toda la lactancia, y secreción vaginal del microorganismo.<sup>26</sup> Esto último posiblemente explica por qué hay corderos seropositivos, lo que dificulta la erradicación del problema, si se realiza con base en la eliminación o castración de machos positivos y no se toma en cuenta a las hembras como transmisoras de la enfermedad.

Por otro lado, es conveniente señalar que la epididimitis en corderos se encuentra comúnmente asociada a microorganismos como *A. seminis* y *H. ovis*, por lo que el diagnóstico diferencial incluye a estos agentes.<sup>4</sup>

Como puede observarse en los resultados, existen animales que son positivos a *B. ovis* en serología y no presentan lesiones testiculares, esto puede deberse al contacto con animales infectados que desarrollaron anticuerpos por exposición, o que se encuentran en estado inicial de la enfermedad. De igual forma, existen animales seronegativos con alteraciones testiculares, lo que hace pensar que si bien la vía sexual es la principal fuente de contagio, se podría considerar que mientras no haya un contacto de la bacteria presente en sistema reproductor con el sistema inmune, no habrá producción de anticuerpos contra el agente. Muchos autores coinciden en que no hay correlación entre epididimitis clínica y serología positiva.<sup>25,27,28,29,30</sup>

La presencia de animales seropositivos y negativos al aislamiento es explicable, dada la forma intermitente de la eliminación de *B. ovis* y su baja concentración en semen, lo que dificulta su aislamiento; por lo que recomiendan realizar muestreos seriados para aumentar las posibilidades de éxito.<sup>2,30</sup> En este trabajo sólo se tuvo la oportunidad de realizar un muestreo.

En el caso de *Actinobacillus seminis*, las cepas que se aislaron se obtuvieron en forma pura. Al realizarles las pruebas bioquímicas de identificación, se observaron variaciones en los resultados, con respecto a la cepa de referencia. Es importante señalar que estas variaciones están descritas en la literatura,<sup>31</sup> y se explican debido a que esta bacteria pertenece a un grupo atípico de microorganismos de la familia *Pasteurellaceae*. Con la finalidad de comprobar su identificación se procedió a realizar la prueba de IDD, con antígeno obtenido por lisis de las bacterias aisladas. Los antígenos producidos con las 2 cepas aisladas dieron líneas claras de identidad con el antisuero producido con la cepa de referencia. También se trabajaron como testigos y de manera simultánea antígenos obtenidos a partir de otras bacterias relacionadas antigenéticamente como *Haemophilus somnus* y *Pasteurella haemolytica*; con ellos se observaron líneas

de precipitación pero no de identidad con *A. seminis*, lo cual permitió la diferenciación de posibles reacciones cruzadas.

Para la determinación de anticuerpos contra *A. seminis* en sueros de ovinos, se observó un comportamiento similar a lo descrito anteriormente. En este caso, se utilizaron como control, antisueros de referencia contra *Pasteurella haemolytica* serotipo 1 y 2, que son los que generalmente se asocian a problemas infecciosos en ovinos; este resultado se comprobó en el rancho 5, en donde los ovinos habían sido bacterinizados contra *Pasteurella*, y se observó un número elevado de animales positivos.

Los microorganismos *H. ovis* y *A. seminis* también han sido mencionados como causantes de reacciones cruzadas, aunque de débil intensidad con *B. ovis*.<sup>7</sup> En la prueba de IDD para *A. seminis* y *B. ovis* se realizaron ensayos con el suero hiperínmune de *A. seminis* y suero de *B. ovis*, pero en ninguno de ellos hubo línea de precipitación, por lo que se descartó una posible reacción cruzada.

Es importante mencionar que el porcentaje de animales seropositivos a brucelas lisas es significativo, ya que en trabajos anteriores se había registrado la presencia de brucelas lisas en ovinos, con un porcentaje de 28.2% y 4.7% de hatos positivos.<sup>23,32,33</sup>

Se observó que la presencia o ausencia de epididimitis no se relaciona con animales seropositivos ni con aislamiento bacteriológico, ya que se aisló *B. ovis* y *A. seminis* de animales con y sin epididimitis clínica en carneros. La seropositividad de los ovinos a *B. ovis*, *A. seminis* y a brucelas lisas se considera elevada.

## Referencias

1. Arteaga JD. Situación y perspectivas de la ovinocultura en México. Memorias del III Simposio de Ovinos de Pelo en Tamaulipas; 1999 julio 28-29; Altamira (Tamaulipas) México. México (Tampico): Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, 1999:35-37.
2. Blasco MJM. Epidemiología, patogenia y cuadro clínico. En: Blasco MJM, Moriyón UI, editores. Brucelosis ovina. Tratado de patología y producción ovina, Zaragoza, España: Luzáns, 1990:25-32.
3. Díaz AE. Presencia de brucelosis ovina en México y estrategias de diagnóstico y prevención. Memoria de la Cuarta Reunión Anual del Consejo Técnico Consultivo de Sanidad Animal; 1995 noviembre 14-17; México (DF). México (DF): Consejo Técnico Consultivo de Sanidad Animal, 1995:178-188.
4. Cleon VK, Schweitzer D. Brucella ovis, infection and its management in ovine reproduction. Agri-Practice 1989;4:36-39.
5. Heath PJ, Davies IH, Morgan JH, Aitken IA. Isolation of *Actinobacillus seminis* from rams in the United Kingdom. Vet Rec 1991;129:304-307.
6. Scanlan CM. Etiopathogenesis of epididymitis in ram lambs. Memorias del V Congreso Nacional de Producción Ovina; 1992 abril 1-4; Monterrey (Nuevo León) México (DF). Asociación Mexicana de Técnicos Especialistas en Ovinocultura, 1992:342-349.
7. Ficapal CA. Brucellosis ovina por *Brucella ovis*: evaluación de pruebas diagnósticas y análisis de la incidencia en Cataluña (tesis doctoral). Barcelona, España: Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona, 1993.
8. Blasco MJM. La epididimitis contagiosa del morrueco. En: Blasco MJM, Moriyón UI, editores. Brucelosis ovina. Tratado de patología y producción ovina, Zaragoza, España: Luzáns, 1990:89-96.
9. Luna LG. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3rd ed. Chicago (ILL): McGraw Hill. 1968.
10. Myers DM. Field evaluation of the gel diffusion test for the diagnosis of ram epididymitis caused by *Brucella ovis*. Appl Microbiol 1973;26:855-857.
11. Canto J, Biberstein EL, Schulte TA, Behymer D. Cross-reactivity of *Haemophilus somnus* antibody in agglutination and complement fixation and in the enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol 1983;17:500-506.
12. Williams MJ, Smith GL, Murdock MF. Immunogenicity of a *Haemophilus somnus* bacterin in cattle. Am J Vet Res 1978;39:1756-1762.
13. Ouchterlony O. Diffusion in gel methods for immunological analysis. Prog Allergy 1962;6:30-154.
14. Núñez TED, Díaz AE, Hernández AL, Trigo TFJ, Suárez GF. Sensitivity and specificity of an ELISA as a screening test for the diagnosis of *Brucella ovis* in sheep. Rev Lat Amer Microbiol 1997;39:123-128.
15. Díaz AE. Diagnóstico de brucelosis caprina. (tesis de doctorado). Pamplona, Navarra, España: Facultad de Ciencias. Universidad de Navarra, 1993.
16. Thayer JD, Martín JE. Selective medium for cultivating *N. gonorrhoeae* and *N. meningitidis*. Publ Health Dept US 1964;79:49-54.
17. Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR. Clinical veterinary microbiology. London (UK): Wolfe Mosby, 1998.
18. Webb RF, Quinn CA, Cockram FA, Husband AJ. Evaluation of procedures for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. Austr Vet J 1980;56:172-175.
19. Jones LM, Dubray G, Marly J. Comparison of methods of diagnosis of *Brucella ovis* infections of rams. Ann Rech Vet 1975;6:11-22.
20. Marín CM, Jiménez-de Begüés MP, Blasco JM, Gamazo C, Moriyón UI, Díaz R. Comparison of three serological tests for *Brucella ovis* infection of ram using different antigenic extracts. Vet Rec 1989;125:504-508.
21. Ris DR, Hamel KL, Long DL. Comparison of an enzyme-linked immunospecific assay with the cold complement fixation test for the serodiagnosis of *Brucella ovis* infection. NZ Vet J 1984;32:18-20.
22. Núñez TE, Díaz AE, Tenorio GV, Trigo TFJ, Suárez GF. Stability of antigen and agarose used in a double immunodiffusion serologic test for *Brucella ovis*. J Vet Diagn Invest 1998;10; 113-115.

23. Núñez TE, Díaz AE, Velázquez QF, Trigo TFJ, Suárez GF. Presencia de anticuerpos contra diferentes especies de *Brucella* en sementales ovinos jóvenes. *Vet Méx* 1997;28:235-240.
24. Sanchis R, Giauffret A. L'epididymite contagieuse du bétier. *Rec Med Vet* 1975;151:791-798.
25. Murray RM. Scrotal abnormalities in rams in tropical Queensland with particular reference to ovine brucellosis and its control. *Austr Vet J* 1969;45:63-67.
26. Grillo MJ, Jiménez de Bagüés CM, Marín M, Blasco MJM, Barberán M. Infección experimental por *Brucella ovis* en ovejas gestantes. *Memorias de las VI Jornadas sobre Producción Animal*; 1995 septiembre 15-18; Madrid, España. Madrid, España: Universidad Complutense, 1995:539-541.
27. Giauffret A, Sanchis R. Etude d'un foyer d'epididymite contagieuse du bétier. Erradication de la maladie. *Bull Org International Epizoot*, 1974;82:581-586.
28. Hughes KL, Claxon PD. *Brucella ovis* infection. *Austr Vet J* 1968;44:41-47.
29. McGowan B. Epididymitis in rams: effect of vaccination and culling on the clinical incidence of the disease. *Cornell Vet* 1979;69:67-72.
30. West DM, Stafford KJ, Alley MR, Badcoe LM, Hilbink F, Compton CWR. Serological and necropsy findings for rams infected with *Brucella ovis* which were not identified by the complement fixation test. *NZ Vet J* 1993;41:82-86.
31. Low JC, Bromley Y, Donachie W, Somerville D. Characterization of *Actinobacillus seminis*. *Memorias del Congreso Haemophilus-Actinobacillus-Pasteurella*; 1996 octubre 13-17; Acapulco (Guerrero) México. Ames (Io): Iowa State University, 1996;35.
32. Díaz AE, Blasco NJM, Marín AC, Moriyón UI, Díaz GR. Diagnóstico de *Brucella melitensis* en ovinos usando inmunodifusión radial con apteno nativo. *Téc Pecu Méx* 1996;34:99-103.
33. Romero MJA, Moreno CB, López NA, Tórtora PJ. Seroprevalencia de brucellosis en ovinos en un modelo de producción campesina en México. *Memorias de la Reunión Anual de la Asociación Mexicana de Técnicos Especialistas en Ovinos*; 1995 julio 15-18; Chapingo (Estado de México) México. México (DF): Asociación de Técnicos Especialistas en Ovinos, 1995:112-115.