



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales

**“EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE Y LAS
ALTERACIONES SEMINALES EN LA INFECCION
EXPERIMENTAL CON *Brucella ovis*”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

PRESENTA

M.C. VÍCTOR MANUEL SÁNCHEZ PARRA

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, octubre 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales

**“EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE Y LAS
ALTERACIONES SEMINALES EN LA INFECCION
EXPERIMENTAL CON *Brucella ovis*”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

PRESENTA

M.C. VÍCTOR MANUEL SÁNCHEZ PARRA

Tutor Académico:

Dr. Jorge Pablo Acosta Dibarrat

Tutores Adjuntos:

Dr. Edgardo Soriano Vargas

Dra. Claudia Giovanna Peñuelas Rivas

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, octubre 2018

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	iv
RESUMEN.....	v
ABSTRAC	vi
DEDICATORIAS	viii
DEDICATORIA PERSONAL.....	viii
DEDICATORIA INSTITUCIONAL.....	ix
FINANCIAMIENTO	ix
INTRODUCCIÓN	1
EPIDIDIMITIS INFECCIOSA OVINA	3
AGENTE ETIOLOGICO: <i>Brucella ovis</i>	4
EPIDEMIOLOGÍA	5
TRANSMISIÓN Y PATOGENIA.....	6
CUADRO CLÍNICO.....	7
LESIONES MACROSCÓPICAS	8
LESIONES MICROSCÓPICAS.....	8
DIAGNÓSTICO	9
CLÍNICO.....	9
SEROLÓGICO	9
DIFERENCIAL.....	10
PREVENCIÓN Y CONTROL.....	10
RESPUESTA INMUNE	11
INMUNIDAD CELULAR.....	11
INMUNIDAD HUMORAL	13
ACTIVIDAD DE CD4 EN LA RESPUESTA INMUNE.....	14
ACTIVIDAD DE CD8 EN LA RESPUESTA INMUNE.....	14
ACTIVIDAD DE LINFOCITOS T $\gamma\delta$ (WC1) EN LA RESPUESTA INMUNE.....	15
AUTOINMUNIDAD	15
INMUNIDAD DE MUCOSAS.....	16
JUSTIFICACIÓN	19
HIPÓTESIS.....	20
OBJETIVO GENERAL	21

OBJETIVOS PARTICULARES.....	21
MATERIALES Y METODOS	22
ANIMALES	22
PREPARACIÓN DEL INÓCULO PARA DESAFIO	22
EXAMEN CLÍNICO	23
EVALUACIÓN DE CANTIDAD DE EYACULADO	23
TOMA DE MUESTRAS	24
OBTENCIÓN DE SUERO	24
EXTRACCIÓN DE SANGRE PARA OBTENCIÓN DE LINFOCITOS.....	25
MUESTRAS PARA HISTOPATOLOGÍA	25
MUESTRAS PARA AISLAMIENTO DE <i>Brucella ovis</i> EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA	26
PCR PARA LA DETERMINACIÓN DE <i>B. ovis</i> EN SEMEN	26
INMUNODIFUSIÓN DOBLE EN GEL (IGDA).....	29
ELISA	29
PROCEDIMIENTO ELISA.....	30
DETERMINACIÓN DE POBLACIONES LINFOCITARIAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	31
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	32
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	33
RESULTADOS.....	36
DISCUSIÓN	72
CONCLUSIONES	81
LITERATURA CITADA.....	82

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	IMAGEN DE LAS GLÁNDULAS ANEXAS DEL APARATO REPRODUCTOR DEL CARNERO.	25
FIGURA 2	DISEÑO EXPERIMENTAL: GRUPOS EXPERIMENTALES.	33
FIGURA 3	DISEÑO EXPERIMENTAL: ANÁLISIS DE RESPUESTA INMUNE POR CITOMETRÍA DE FLUJO.	34
FIGURA 4	DISEÑO EXPERIMENTAL: PRUEBAS SEROLÓGICAS.	34
FIGURA 5	LÍNEA DE TIEMPO PARA EL TRABAJO EXPERIMENTAL.	35

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1	TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DE DNA DE MUESTRAS DE SEMEN.	27
TABLA 2	INICIADORES USADOS EN LA PRUEBA DE PCR PARA EL DIAGNÓSTICO DE <i>B. ovis</i> .	27
TABLA 3	VOLÚMENES UTILIZADOS PARA LA PRUEBA DE PCR.	28
TABLA 4	CONDICIONES PARA LA REALIZACIÓN DE LA PRUEBA DE PCR.	28
TABLA 5	VALORES DE INTERPRETACIÓN EN PRUEBA DE ELISA.	31
TABLA 6	MARCADORES USADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE POBLACIONES DE LINFOCITOS.	32

RESUMEN

La brucelosis ovina es una enfermedad infecciosa que produce pérdidas en la ovinocultura, la *Brucella ovis*, es una bacteria que es capaz de vivir dentro de las células del huésped, lo que hace difícil su diagnóstico y control. En este trabajo se desafiaron experimentalmente carneros con *B. ovis* por las vías endovenosa y mucosal (lavado prepucial e instilación conjuntival) para evaluar la respuesta inmune humoral y celular, así como los cambios patológicos ocasionados por *B. ovis* sobre los órganos del aparato reproductor de los carneros desafiados. Se utilizaron 18 carneros de 1 a 4 años y libres de *B. ovis*; que se distribuyeron en tres grupos: Grupo 1 (n= 6): Control; Grupo 2(n= 6) inoculación en mucosas (*B. ovis*), y Grupo 3 (n= 6) inoculación vía intravenosa. Se evaluó la respuesta inmune serológica usando las técnicas de ELISA e IGDA. Se inunotipificaron por citometría de flujo poblaciones de linfocitos CD4 y CD8 a los 120, 150 y 189 dPI, y de WC1 (linfocitos $\gamma\delta$) a los 120 dPI. 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, sangre entera y semen entre los d0 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 descender ($P<0,05$). 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. Así mismo se encontraron diferencias en las MIF de los linfocitos CD8 en el grupo control y el grupo endovenoso ($p<0,05$) a los 120 dPI, con medias de 1027,4 y 499,6 respectivamente. Estas diferencias se observaron también entre los carneros del grupo control y los grupos mucosal y endovenoso respectivamente para las MIF de los linfocitos CD4 ($p<0,05$) a los 189 dPI. Las poblaciones de linfocitos T $\gamma\delta$ (WC1) a los 120 dPI presentaron diferencias en MIF entre el grupo control y los grupos mucosal y

endovenoso ($p < 0,05$). *Brucella ovis*, puede modular la respuesta inmune del hospedero, los linfocitos CD4 y CD8 son importantes para la defensa del hospedero durante la infección causada por *B. ovis*, estos linfocitos pueden fluctuar durante la infección. Los linfocitos $\gamma\delta$ podrían ser un factor importante para el control de la infección causada por *B. ovis*.

ABSTRAC

The ovine brucellosis is an infectious disease that causes economic losses in the ovine cultura, *Brucella ovis* is a bacteria that survives inside the cells of the host, its difficult a diagnosis and control. In this study, rams with *B. ovis* were experimentally infected by intravenosus and mucosal routes (preputial and conjuntival instillation) to evaluate the humoral and the cellular immune response, tha aim was evaluate the pathological changes caused by *B. ovis* on the reproductive system, was used 18 rams from 1 to 4 years old and they are free from *Brucella ovis*: they were placed into three groups: Group 1(n=6): Control; Group 2(N=6), inoculation in mucous membranes (*B. ovis*) and Group 3(n=6): intravenous inoculation. The serological immune response was evaluated using ELISA and IGDA techniques. Through flow cytometry the changes and relation ship o the immune response in the challenges rams were determinated using specific markers for CD4, CD8, lymphicytes $\gamma\delta$ (WC1), MHCI and MHCII, IgM, IgG, and IgA. Thacing of a ram⁻¹ group⁻¹ was carried out for 189 post-IE were. Samples of 2mL of blood serum, whole blood and semes between 0d and 189 d post-IE were processed by the PCR polymerase chain rection technique. The statistical analysis was performed using categorical models and repeated measurements. ELISA showed more sensitivity ($P < 0,05$) for detection of serpositive rams (CS) starting 3 d post IE, at 21 D post IE, reached its máximo detection of CS (100%) in both groups IE ($P < 0, 05$). At 56d post-IE, the CS rate stated to fall ($P < 0,05$). In 83% of the CS presentex: 50% in the right testicle and 33,3% in the left testicle, in rams with intravenous IE. In this group, 16, 6% of CS presented adhesionsnd granulomas in head, body and tail of the righ epididymis. The use of the IGDA test, wich is the stablished by the official mexican standard (NOM-041-ZOO-1995), it does not allow detect seropositive animals early, wich it does not allow at the programs control the disease. Were found differences in the MIF of the

CD8 lymphocytes in the control group and the endovenous group ($p < 0.05$) at 120 dPI, 1027.4 and 499.6 respectively. These differences were also observed between the rams of the control group and the mucosal and endovenous groups respectively for the MIF of the CD4 lymphocytes ($p < 0.05$) at 189 dPI. The lymphocytes T $\gamma\delta$ (WC1) at 120 dPI showed differences in MIF between the control group and the mucosal and endovenous groups ($p < 0.05$). *Brucella ovis*, apparently modulate the immune response of the host, CD4 and CD8 lymphocytes are important for host defense during infection caused by *B. ovis*, these lymphocytes can fluctuate during infection. The $\gamma\delta$ lymphocytes could be an important factor for the control of the infection caused by *B. ovis*.

DEDICATORIAS

DEDICATORIA PERSONAL

A Mis padres, por enseñarme que siempre hay un camino por recorrer; por mostrarme que nada es sencillo, que el batallar es día a día, sin perder los objetivos; por el cariño que me han prodigado y porque sin limitaciones, sé que siempre contaré con ellos.

A Susana, por ser y estar siempre en todos los proyectos que emprendemos, en los verdes y los maduros. Por el apoyo que me brinda, pero sobre todo por que ha colmado mi vida de dicha y amor.

A VADARA, que me han enseñado que los límites no existen, por que han fungido como los maestros más exigentes de este plano, y porque el recuerdo de sus miradas me llena de esperanza.

A mis hermanos, en los cuales encuentro siempre la respuesta de todo lo que busco, y en ellos tengo lo mejor sin condiciones.

A mis amigos, de los cuales he cosechado lo mejor de una zaga de complicidades, acompañamiento y gozo. Seguro que aún hay capítulos por escribir.

Al Ruy, que me ha mostrado que se puede exigir uno más allá, que los niveles de conocimiento no siempre tienen una correlación con los grados académicos, y que los sistemas siempre tienden a estabilizarse, gracias por el apoyo sincero y el sarcasmo del diario acontecer.

A Jorge Acosta, que ha tenido para mí una paciencia de Santo.

A mi comité tutorial, por que de cada uno de ellos he aprendido que la búsqueda del conocimiento es una labor inacabada.

Al ser que ha sido, es y será.

DEDICATORIA INSTITUCIONAL

A la Universidad Autónoma del Estado de México, que me brindo espacio dentro de sus aulas y laboratorios, en donde se me puso a prueba, lugar sacro donde amplíé mi umbral de Humildad.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, que me brindo la oportunidad de transformar mi visión académica haciéndola más humanista. Creo en mí, creo en la Universidad Michoacana, soy orgullosamente Nicolaíta!!!

Al CONACyT, que a través de la Beca que me brindo, me permitió la consecución de un sueño anhelado.

Al Programa PRODES, que me facilitó toda una gama herramientas para concluir y habilitarme en busca de mejorar mi desempeño académico.

Al CNID-Microbiología INIFAP por la donación de la cepa utilizada como inóculo para el trabajo experimental.

FINANCIAMIENTO

Este trabajo de investigación fue financiado por el proyecto PROMEP/103.5/10/4368.

Y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), bajo el Programa de Consolidación Institucional de Grupos de Investigación. Retención Ref: 09-01.117071.

INTRODUCCIÓN

La epididimitis ovina es una enfermedad infecciosa, contagiosa, de presentación clínica o subclínica, y se caracteriza por la inflamación del epidídimo, en forma secundaria puede desencadenar degeneración testicular, y en consecuencia causar irreversible en carneros (Carvalho, *et al.*, 2012).

Brucella ovis (*B. ovis*) es reconocido como el principal agente causal de la epididimitis en carneros, su epidemiología y patogenia se han documentado desde hace tiempo (Birbestein, *et al.*, 1964; Brown, *et al.*, 1973; Burgess, 1982).

La prevalencia de la epididimitis causada por *B. ovis* varía entre el 5% y el 100% (Beeman, *et al.*, 1982) de los carneros de un rebaño, pero habitualmente se encuentra entre el 10% y el 40%. Los estudios serológicos realizados en el altiplano mexicano mediante la técnica de ELISA demostraron una prevalencia del 22.5%; por otro lado, es importante considerar que la prevalencia de la enfermedad aumenta en sistemas de producción con un alto número de sementales y vientres (Carrera, *et al.*, 2013).

La infertilidad de los carneros deriva de las lesiones que produce la infección por *B. ovis*, afecta principalmente al epidídimo y de manera secundaria a los testículos, como consecuencia se produce una mala calidad de semen, esto incrementa la eliminación de carneros de los sistemas de producción (Ridler y West, 2011). En cuanto a las ovejas infectadas por *B. ovis* se han reportado abortos y nacimientos de corderos débiles (Huges, 1972; Burgess, 1982; Paolicci, *et al.*, 2013).

Como se mencionó anteriormente, en los carneros, las lesiones se presentan principalmente en epidídimos, y de manera secundaria en los testículos, dichas lesiones pueden detectarse por palpación a través de la cual, se pueden encontrar engrosamiento y endurecimiento en el epidídimo, especialmente de la cabeza y cuerpo (Paolicchi, *et al.*, 2000; Carvalho, *et al.*, 2012). Por otro lado, se ha reportado que no todos los carneros afectados presentan lesiones (Costa, *et al.*, 2012; Paolicci, *et al.*, 2013), sin embargo al encontrarse infectados, pueden liberar la bacteria de manera intermitente en los eyaculados con la agravante de que no se muestran enfermos, lo que contribuye a la permanencia de la enfermedad dentro de los sistemas de producción ovinos (Ridler y West, 2011; Paolicci, *et al.*, 2013; Ridler, *et al.*, 2013).

Las pruebas que actualmente son usadas para el diagnóstico serológico de la brucelosis en ovinos, son ELISA, Inmunodifusión doble en gel (IGDA) y Fijación de Complemento (FC), recomendadas por la Organización Mundial de Sanidad Animal, (OIE 2009) éstas, detectan anticuerpos en sangre contra la *B. ovis*, lo que permite separar a los animales infectados; en términos generales son pruebas rápidas, relativamente económicas y prácticas (França, *et al.*, 2011; Ridler, *et al.*, 2014; Moustacas, *et al.*, 2015).

Una vez que *B. ovis* infecta a algún carnero, se encuentra relativamente protegido dentro del tracto reproductivo del animal infectado, debido sobre todo a la internalización de la bacteria resultado de la fagocitosis, la bacteria es conducida al interior del retículo endoplásmico rugoso de las células inflamatorias, lo que le permite evadir la destrucción dentro de los fagolisosomas, y aunque de esa manera las bacterias no se replican, pueden pervivir dentro del animal infectado. Esta podría ser la razón por la que en ciertos casos se aísla *B. ovis* de carneros infectados a partir de tejidos libres de lesiones histológicas (Paolicchi, *et al.*, 2000).

En este trabajo se evaluó la respuesta inmune serológica usando las técnicas de ELISA e IGDA en la infección experimental con *B. ovis* por vía mucosal (lavado prepucial, e instilación conjuntival), y vía endovenosa, así mismo se revisaron algunos aspectos inmunopatológicos de la epididimitis y el desarrollo de la respuesta inmune celular, asociada a la infección con *B. ovis* en carneros.

EPIDIDIMITIS INFECCIOSA OVINA

Existen muchas enfermedades que causan problemas de fertilidad en los carneros, sin embargo *B. ovis* es la causante de un problema que cobra importancia debido que en la mayoría de los casos, la infección ocurre de forma subclínica, y sólo al paso de los meses los productores notan los efectos causados por la enfermedad producida por *B. ovis* (Ridler y West, 2002).

Esta enfermedad se produce en carneros y es importante diferenciarla de otras afecciones causadas por otras entidades, por ejemplo la epididimitis causada por *Histophilus*, y *Actinobacillus* que se presenta principalmente en individuos menores a un año de edad, a diferencia de lo que ocurre con la infección de *B. ovis* en donde se ven afectados sobre todo los animales que han alcanzado la madurez sexual (Al-Katib y Dennis, 2007).

La epididimitis infecciosa ovina es causada por la bacteria *B. ovis* cuya capacidad para sobrevivir y replicarse dentro de las células del huésped le confieren un grado importante de patogenicidad (Estein, 1999; Estein *et al.*, 2009; Galindo, *et al.*, 2009; Cloeckaert, 2002).

La brucelosis a nivel mundial produce pérdidas económicas importantes en la producción animal, y en el caso de los ovinos, las mermas económicas están relacionadas por conceptos de manejo extra dentro de los sistemas de producción tales como vacunaciones, traslado de animales a enfermería, lotificaciones especiales, así mismo existen gastos por disminución de la fertilidad y la capacidad reproductiva tanto de hembras como de machos (González, 1994; Godfroid, 2011; Paolicci, 2011).

B. ovis es una bacteria que generalmente se localiza en los tejidos reticuloendoteliales, órganos reproductivos, articulaciones y huesos, ocasionando infecciones crónicas. En los carneros afecta el aparato reproductor además de cursar como bacteriemias recurrentes y en las hembras puede provocar abortos (Huges, 1972; Estein, 1999; Cloeckaert, 2002; Moreno, *et al.*, 2002; Grilló, *et al.*, 2009); como se mencionó, en los carneros principalmente afecta el aparato reproductor (Estein, 1999; Paolicchi, *et al.*, 2000; Carvalho, *et al.*, 2012; Costa, *et al.*, 2013), con la consecuente afección en las características seminales.

De la epididimitis infecciosa de los carneros se han documentado datos tanto de la patogenia, y lesiones (Birbestein, *et al.*, 1964; Huges, 1972; Brown, *et al.*, 1973; Ficapal, *et al.*, 1998; Carvalho, *et al.*, 2012). *B. ovis* se ha reportado como causante de la enfermedad reproductiva infecciosa en ovinos con mayor distribución mundial, esta enfermedad puede producir

inflamación en las envolturas testiculares con material serofibrinoso en los casos agudos, y en los casos crónicos, epididimitis y quistes espermáticos (Kimberling, 1987; Carvalho, *et al.*, 2012); tanto en los casos agudos como en los crónicos, la consecuencia directa son problemas relacionados con el proceso reproductivo, por un lado con una variable infertilidad en machos y, en el caso de las hembras abortos y nacimiento de corderos débiles (González, 1994; Grilló, *et al.*, 2009; Praud, *et al.*, 2012; Paolicci, *et al.*, 2013).

AGENTE ETIOLOGICO: *Brucella ovis*

A diferencia de otras especies de *Brucella*, no se han comprobado casos en humanos por *B. ovis* (Ficapal, *et al.*, 1998; Acha y Szyfres, 2001), se sabe que tiene predilección principalmente por el aparato reproductivo de los carneros donde afecta la calidad seminal (Estein, 1999; Estein, *et al.*, 2009).

La brucelosis es una enfermedad infecciosa causada por bacterias del género *Brucella*, ésta se caracteriza por ser un cocobacilo Gram negativo, sin capsula, sin flagelo, intracelular facultativa que puede vivir dentro de macrófagos y células epiteliales (Estein, 1999; Burgess, 1982). A nivel mundial es ampliamente referida como el “microorganismo de la epididimitis del carnero” *B. ovis* es conocida como el agente causal más importante de dicho padecimiento (Hungerford, 1975).

B. ovis se aisló por primera vez en Nueva Zelandia por Buddle y Boyes en 1953, y McFarlane *et al* en 1952 reportaron la infección a partir de ovejas que abortaron. En 1953 la epididimitis en carneros se reportó simultáneamente por Simmons y Hall en Australia y por Buddle y Boyes en Nueva Zelandia. En 1956 es reportada por primera vez en Norte América y en 1961 en Argentina por Szyfres y Chappel que aislaron *B.ovis* del semen de carneros con epididimitis (Burgess, 1982; Paolicchi, *et al.*, 2000).

Brucela ovis es un cocobacilo Gram negativo, no capsulado que mide entre 0.7 μ a 1.2 μ de largo por 0.5 μ a 0.7 μ de ancho. Se tiñe de rojo con la técnica de Ziehl Neelsen modificada y se tiñe de azul con la técnica de Koster modificada. Crece bien en medios basales como el tripticasa-soya, agar sangre y agar columbia, enriquecidos con 7% de suero o sangre desfibrinada en una atmósfera con un 10% de Dióxido de carbono y actualmente hay una sola biovariedad descrita para *B.ovis* (Robles, 1998; Estein, 1999).

EPIDEMIOLOGÍA

Si bien la transmisión venérea es la principal vía de contagio en machos sexualmente maduros (Bulgin y Anderson, 1983; Bulgin y Anderson, 1990; OIE, 2009; Carvalho, *et al.*, 2012), el contagio de carneros vírgenes se produce frecuentemente durante los períodos de estabulación prolongada durante los cuales dichos carneros entran en contacto con orina de animales infectados (Estein, 1999). En estas condiciones la bacteria ingresa al organismo a través de las mucosas nasal (olfateo), oral (lamido), conjuntival o por la vía percutánea a través de heridas o escoriaciones (Buddle, 1983; Bulgin y Anderson, 1983). Asimismo, la conducta homosexual de los machos fuera de la época de empadre, favorece la entrada del microorganismo a través de la mucosa rectal (sodomía).

El carnero infectado con *B. ovis* constituye el principal reservorio en el rebaño, y el semen es la fuente de diseminación de la enfermedad, por otro lado, se ha reportado que la eliminación de *B. ovis* en semen es intermitente y por períodos prolongados, habiéndose hallado cultivos positivos hasta 80 semanas post-infección experimental (Paolicci, 1991; Praud, *et al.*, 2012).

B. ovis no afecta la concepción en ovejas, sin embargo puede provocar mortalidad embrionaria con infertilidad transitoria en la oveja, y en menor proporción, abortos hacia el final la gestación (Paolicci, *et al.*, 2013), al parecer, el aborto es causado por la placentitis que afecta la nutrición fetal y bien, ocasiona abortos o el nacimiento de corderos prematuros o débiles, en este último caso, al sobrevivir los corderos infectados, éstos pueden ser un potencial portador de la bacteria, además que puede desarrollar la enfermedad al alcanzar la madurez sexual (Buddle, 1983; Praud, *et al.*, 2012).

En el caso de las hembras, éstas se recuperan de la infección luego del parto o del aborto, sin embargo, se ha reportado que continúan excretando *B. ovis* a través de las secreciones vaginales y uterinas, placenta y loquios. Por otro lado, si bien la leche es una potencial fuente de infección, no existe información de la transmisión por esta vía al cordero lactante (Huges, 1972; Paolicci, *et al.*, 2013), sin embargo en el caso de los desechos vaginales, si constituyen un elemento importante para la persistencia de la enfermedad dentro del rebaño, puesto que estos desechos vaginales infecciosos podrían entrar en contacto con carneros susceptible (Huges, 1972).

TRANSMISIÓN Y PATOGENIA

La *B. ovis* puede liberarse en el semen de los animales infectados, y en consecuencia ser la fuente de transmisión a los animales susceptibles una vez que la bacteria entra en contacto con las membranas mucosas (Kimberling, 1987).

Durante la estación no reproductiva, es común que se lotifiquen animales de diferentes edades, así los carneros conviven con animales de diferentes edades y condición corporal; si alguno de ellos se encuentra afectado por la *B. ovis*, por cualquiera de las vías antes mencionadas se podría producir el contagio; por otro lado, durante la época de empadre uno o varios carneros pueden servir a una misma hembra y por este contacto sexual infectarse con el semen de algún carnero infectado, o bien al entrar en contacto vía vaginal con alguna hembra infectada (Kimberling, 1987).

En resumen, el semen de los animales infectados puede entrar en contacto con los animales susceptibles por las siguientes vías:

- 1.- Contacto rectal por coito homosexual
- 2 Vía vaginal de hembras en celo, previamente expuestas a animales infectados
- 3.- Mucosa de pene y prepucio durante monta homosexual
- 4.- Pene y prepucio de machos durante coito heterosexual
- 5.- Mucosas oral y nasal por olisqueo y lamidos de orina y/o material contaminado (Kimberling, 1987).

Una vez que la bacteria entra en contacto con la mucosa, penetra en el tejido del huésped y llega a los nódulos linfoides regionales a través de la vía linfática aferente. Posteriormente, se produce una hiperplasia de células reticuloendoteliales, algunas bacterias pasan a través de los nódulos y vía sanguínea para difundirse en otros órganos, finalmente se localizará en el aparato reproductor tanto en los epidídimos, vesículas seminales, glándulas Bulbouretrales y ámpulas principalmente (Birbestein, *et al.*, 1964; Kimberling, 1987).

Entre los 21 a 45 días después de la exposición original, el epidídimo puede desarrollar lesiones macroscópicas, y aproximadamente a los 60 días, la infección se disemina a tanto a los nódulos linfáticos, al bazo e hígado. Una vez que la bacteria llega a localizarse en el epidídimo, se inician cambios alrededor del sitio afectado, los fluidos se acumulan en el tejido intersticial y las células linfoides y células plasmáticas se congregan en los vasos sanguíneos, especialmente los neutrófilos que migran al interior del conducto epididimal, posteriormente las células experimentan hiperplasia creando pliegues que obstruyen el lumen y desarrollan quistes murales (Birbestein, *et al.*, 1964; Kimberling, 1987).

Posteriormente, las masas de espermátidas se acumulan próximas a la oclusión y se extravasan en el tejido intersticial, así los segmentos de los conductos (repletos de espermátidas) desencadenan una reacción inflamatoria de tipo granulomatosa. Finalmente, como consecuencia, y posterior a la obstrucción completa de los conductos epididimarios, los túbulos seminíferos degeneran y los testículos se atrofian (Kimberling, 1987).

En cuanto a la calidad del semen, éste puede variar en el número de espermatozoides, leucocitos y bacterias, motilidad y deformidades independientemente de las lesiones macroscópicas mencionadas anteriormente.

Al disminuir la bacteriemia, se desarrolla una respuesta serológica (aproximadamente a los dos meses), y los anticuerpos séricos pueden aparecer dos semanas después y persistir por meses o años (Kimberling, 1987).

CUADRO CLÍNICO

Al inicio de la infección existe una reacción sistémica caracterizada por fiebre, depresión e incremento del gasto respiratorio, posterior al proceso de incubación (2-8 semanas) se observan las primeras lesiones que en los casos agudos se muestran como leves crecimientos e induraciones del epidídimo, algunas veces concurrentes con dolor, por otro lado, puede observarse inflamación y engrosamiento del escroto y su contenido; en esta etapa aún no se involucran cambios testiculares. En algunos casos agudos los signos pueden remitir y no presentar lesiones mayores (Hungerford, 1975).

Al avanzar la infección, el agrandamiento del epidídimo se vuelve fibroso y el testículo pierde consistencia y se atrofia. Aunque las lesiones son principalmente en la cola del epidídimo, se pueden ver afectados cuerpo y cola del mismo, es común encontrar abscesos que pueden ser fluctuantes a la presión digital (Carvalho, *et al.*, 2012).

Por otro lado los carneros infectados pueden presentar libido normal y la calidad seminal es variar considerablemente, pudiendo observarse en algunas ocasiones menor cuenta espermática, presencia de leucocitos, decremento de motilidad espermática, incremento de las alteraciones espermáticas (Kimberling, 1987).

LESIONES MACROSCÓPICAS

A la necropsia pueden encontrarse lesiones limitadas al aparato reproductor, La túnica vaginal puede adherirse en uno o varios puntos al epidídimo, en los estadios tempranos de la infección puede observarse un leve crecimiento e induración de la parte afectada del epidídimo, el testículo puede no presentar cambios de tamaño (Kimberling, 1987; Paolicchi, *et al.*, 2000; Carvalho, *et al.*, 2012).

En estados avanzados el epidídimo infectado puede estar considerablemente aumentado de tamaño y más firme. Al cortar la superficie pueden encontrarse granulomas de células espermáticas con contenido cremoso (Carvalho, *et al.*, 2012), así mismo pueden aparecer también fibrosis y abscesos con focos mineralizados. Los testículos pueden aparecer suaves y atróficos (Kimberling, 1987).

LESIONES MICROSCÓPICAS

Los conductos del epidídimo pueden estar dilatados y parcialmente llenos de espermátides y leucocitos. Es frecuente encontrar granulomas de células espermáticas; las capas epiteliales pueden presentar hiperplasia a menudo formando quistes murales. Los túbulos seminíferos pueden presentar atrofia en diversos grados. Algunos consistentes de capas de membrana basal con células de Sertoli y otras de membrana basal colapsada (Carvalho, *et al.*, 2012) (Kimberling, 1987).

En el ámpula existe una variedad de cambios tanto en la pared y epitelio del ámpula y conducto deferente, algunas veces se encuentran áreas focales de necrosis, y los neutrófilos pueden estar presentes entre las células del epitelio y distribuidas entre los espermatozoides y el lumen del ámpula.

En las vesículas seminales los neutrófilos se distribuyen entre las células de la lámina propia del septo y el epitelio, pueden estar presentes en el lumen de las dilataciones saculares formadas por el epitelio; los cambios en el epitelio varían desde hiperplasia a cariólisis y pinocitosis (Kimberling, 1987).

DIAGNÓSTICO

CLÍNICO

El diagnóstico de la epididimitis contagiosa del carnero se basa en la combinación del examen clínico y su confirmación mediante el aislamiento en el laboratorio de *B. ovis* en el semen y/o resultados positivos en las pruebas serológicas (Alton, 1988; Nakada, *et al.*, 2011; Costa, *et al.*, 2013).

El examen clínico consiste en la palpación del contenido escrotal, aunque el 50% de los animales infectados no desarrollan una epididimitis palpable lo que los hace portadores y transmisores de la enfermedad, sin embargo el hallazgo de un animal con epididimitis dentro de la granja, es solo orientativo y por tanto, se debe realizar el diagnóstico diferencial (Estein, 1999; Ridler y West, 2002).

SEROLÓGICO

En el laboratorio se realizan diversas pruebas para el diagnóstico serológico de la infección causada por *B. ovis*. Entre las recomendadas por la OIE se encuentran Fijación de Complemento, IGDA, y ELISA (OIE, 2009).

Fijación de Complemento, es una prueba con buena sensibilidad, sin embargo al llevar a cabo un número grande de pruebas, la técnica se torna complicada, por otro lado, se ha reportado que los sueros con algún grado de hemólisis presentan problemas para realizar la lectura de las pruebas.

Inmunodifusión doble en gel (IGDA) es una prueba excelente para el diagnóstico de la enfermedad, sin embargo se ha reportado con una menor sensibilidad y especificidad que la prueba de ELISA (Nakada, *et al.*, 2011; Costa, *et al.*, 2013).

La prueba de ELISA supera en sensibilidad y especificidad a algunas pruebas serológicas y permite el procesamiento de un gran número de muestras simultáneamente, además la hemólisis o anticomplementariedad del suero no afectan la reacción. La desventaja que presenta esta prueba es que se requiere un espectrofotómetro para la lectura de la placa lo que implica un mayor costo inicial.

Los mejores resultados para el diagnóstico de la Brucelosis ovina se han obtenido por la combinación de la inmunodifusión en gel y ELISA resultando en una sensibilidad del 100% (Estein, 1999).

DIFERENCIAL

El diagnóstico diferencial de la epididimitis causada por *B. ovis*, requiere considerar epididimo-orquitis (epididimitis de los corderos) causada por *Actinobacillus seminis* (Acosta Dibarrat, *et al.*,2006; Acosta Dibarrat, *et al.*,2007) e *Histophilus somni* (Palomares, *et al.*; 2005) esta enfermedad y la epididimitis infecciosa de los carneros son indistinguibles clínicamente, sin embargo las pruebas serológicas pueden ayudar a diferenciar los casos entre ambas enfermedades. También se deben considerar otros problemas tales como mineralización testicular y varicocele. La mineralización testicular es generalmente unilateral, y en estados avanzados el testículo es duro como piedra pero puede ser de tamaño normal, mientras que el epidídimo puede estar de tamaño normal. En los casos de varicocele de la vena interna espermática, se pueden encontrar masas nodulares firmes en el cordón espermático proximal al plexo pampiniforme (Kimberling, 1987).

Los abscesos causados por *Corynebacterium pseudotuberculosis* pueden ocurrir en cualquier parte del testículo, epidídimo y túnica vaginal, estas lesiones pueden ser grandes, y mostrar descarga de exudado a la superficie escrotal a través de una fístula. Los abscesos pequeños en la cola del epidídimo pueden ser indistinguibles de la epididimitis causada por *B. ovis*, y la epidídimo orquitis.

Por otro lado los cultivos bacterianos pueden servir como una herramienta importante para identificar específicamente los problemas de carácter bacteriano (Hungerford, 1975; Kimberling, 1987).

PREVENCIÓN Y CONTROL

La importancia de los programas de control de la enfermedad radican en que su objetivo principal está dirigido a evitar la difusión de la infección entre los carneros (Kimberling, 1987).

Los siguientes procedimientos son efectivos para reducir la incidencia y establecer granjas libres de la enfermedad:

- 1.- Separar corderos vírgenes de animales mayores y potencialmente infectados, y nunca mezclar animales libres con animales infectados.

2.- Realizar pruebas a todos los carneros después de la estación reproductiva (durante la estación de anestro) usando la prueba de ELISA para *B. ovis*. Identificar y eliminar a todos los animales positivos. Repetir el procedimiento a intervalos de 45-60 días durante este período hasta que el rebaño se encuentre libre de *B. ovis*. Simultáneamente podría realizarse palpación de epidídimo junto con las pruebas de ELISA, y se deberán eliminar los animales que a la palpación presenten lesiones macroscópicas.

Los animales negativos deben colocarse en ambientes limpios. Subsecuentemente cada año se deberá realizar la prueba de ELISA y la revisión clínica durante la estación de baja actividad sexual para determinar el estatus del rebaño.

3.- Se sugiere la vacunación de los animales a los 4-5 meses de edad con *B. melitensis* rev1, así mismo, la vacunación con *B. ovis* tampoco confiere buena protección y al igual que la anterior interfiere con las pruebas serológicas contra *B. melitensis*, sin embargo se han realizado trabajos encaminados a evitar esos problemas, por ejemplo se trabaja actualmente con *B. canis* para realizar una vacuna que permita el desarrollo de inmunidad sin interferir con las pruebas en cuestión (Estein, 1999; Díaz, et al., 2013).

4.- Al adquirir carneros para el sistema de producción, antes de introducirlos al sistema en mención, previamente deberán tener dos pruebas negativas de ELISA (Kimberling, 1987; Ridler y West, 2002).

RESPUESTA INMUNE

INMUNIDAD CELULAR

La respuesta inmune se desarrolla en los tejidos infectados por la *B. ovis*, en estos tejidos se observan lesiones generalmente crónicas y granulomatosas que son características en este proceso (Gomes, *et al.*, 2006). Los macrófagos, neutrófilos y linfocitos responden a la quimiotaxia producida por las proteínas y polisacáridos de las bacterias del género *Brucella*, en este sentido, secuencialmente responden primero los neutrófilos, después los macrófagos y finalmente los linfocitos.

La *Brucella* es una bacteria con capacidad de sobrevivencia intracelular; una vez que los neutrófilos establecen contacto con la bacteria, se lleva a cabo una endocitosis favorecida por la opsonización causada por el complemento, en esta etapa algunas bacterias sobreviven dentro de los neutrófilos y son conducidas a los nódulos linfoides regionales (Estein, 1999).

Para neutralizar a las bacterias, los neutrófilos utilizan el sistema hidrógeno-mieloperoxidasa y complejos con peróxido, sin embargo como se mencionó anteriormente algunas bacterias pueden sobrevivir dentro de los neutrófilos, en este caso se ha reportado que las especies lisas de brucellas muestran mayor resistencia y sobreviven a la endocitosis debido al LPS (Lipopolisacárido) que inhibe la degranulación, y evade la acción evitando la unión fagosoma-lisosoma, por ello se considera al LPS un factor de virulencia contra la acción de los neutrófilos (Estein, 1999).

Por otro lado se ha reportado que en una etapa incipiente de la infección, el control está a cargo de los anticuerpos, el complemento y las citocinas activadoras de macrófagos producidas por células NK (Galindo, *et al.*, 2009).

En el caso de los macrófagos también ven mermada su función defensora porque la bacteria inhibe la producción del Factor de Necrosis tumoral alfa (TNF- α), que es una de las principales citocinas pro inflamatoria, interviniendo con las señales autócrina y parácrina de los macrófagos, por otro lado se ha inferido la tolerancia al patógeno causada por la falta del TNF- α durante la fase de infección e inflamación (Jiménez de Bagües, *et al.*, 1995).

La falta de citocina pro inflamatoria provoca defectos en la producción de Interleucina 12 (IL-12), esencial para la activación de Th 0 y la acción protectora de las células Th 1, así como de las células de memoria (Jiménez de Bagües, *et al.*, 1995).

La evasión de la respuesta inmune que permite a las *Brucellas* sobrevivir al medioambiente interno del macrófago o de cualquier tipo de célula con función fagocítica, es facilitado por la presencia del LPS, además que los macrófagos fagocitan a las *Brucellas* a un ritmo muy bajo (Jiménez de Bagües *et al.*, 2005); el LPS está formado por tres componentes: lípido A, el núcleo o “Cor” y un antígeno O, que es ausente en las *Brucellas* de tipo rugoso (Estein, 1999; Gomes, *et al.*, 2006).

El LPS bacteriano es reconocido por CD14 en conjunto con moléculas de la familia “Toll like Receptor” (TLR), el CD14 está formado por un dominio transmembranal y dominios intracelulares necesarios para la traducción de la señalización, y junto con las moléculas TLR desempeñan un papel preponderante para la inducción pro inflamatoria de citocinas, producción de TNF- α e IL-12 (Gomes, *et al.*, 2006).

Se ha mencionado que la señalización durante la infección con *Brucella* esta mediada por dos ligandos: para lipoproteínas a través de TLR2 y para el LPS por TLR4, también se sabe que

mientras la activación disminuye, aumenta la MyD88 (mieloid differentiation) proteína codificadora para el gen de las citoquinas- siendo por ello la molécula más importante para la protección del hospedador en contra de la *Brucella* (Gomes, *et al.*, 2006).

Una vez que las brucellas se han fagocitado son contenidas en un endosoma temprano, que es una estructura que se fusiona con el autofagosoma que contiene proteínas generadas por el T4S, de este modo se produce un medio acidificado, al inhibir la fusión con los lisosomas, se mantienen características de una vacuola normal pudiéndose asociar al Retículo Endoplásmico (RE) donde las *Brucellas* pueden sobrevivir y replicarse (Gomes, *et al.*, 2006; Santos, *et al.*, 2013).

INMUNIDAD HUMORAL

B. ovis es una bacteria intracelular facultativa, capaz de sobrevivir y multiplicarse en el interior de macrófagos evadiendo la actividad de los anticuerpos.

La respuesta inmune humoral contra *B. ovis* ha sido estudiada a través de pruebas serológicas, en los que se han identificado antígenos individuales y su inmunodominancia en el curso de la respuesta humoral a *B. ovis*. Los estudios realizados en ovinos infectados natural y experimentalmente, indican que la respuesta inmunitaria humoral ha estado dirigida principalmente contra el antígeno LPS-R y las (Proteínas de Membrana Externa) PME del grupo 3, ambos expuestos en la superficie de la *Brucella* y presentes en el extracto salino caliente (HS) (Estein, 1999).

Algunos estudios de la respuesta inmune contra *B. ovis* se realizaron en un modelo biológico murino, donde se administraron antígenos monoclonales (Acm) que permitieron la identificación de antígenos contra proteínas externas de las *Brucellas* y anti-LPS-R (rugoso) previa a la inoculación de *B. ovis*. Los resultados de estos ensayos mostraron que las PME menores y Omp31, son importantes en la inmunidad humoral, además de la participación del LPS-R con cierta función protectora (Estein, 1999; Jiménez de Bagüés, 1994) (Jimenez de Baiés, *et al.*, 2005).

Se ha propuesto que entre los mecanismos de protección, la opsonización tiene un papel preponderante en la muerte intracelular de la bacteria, donde los anticuerpos juegan un papel determinante, mientras que la muerte extracelular de la bacteria estaría mediada por el complemento o por las células "natural killer" NK (Estein, 1999; Jiménez de Bagüés, *et al.*, 1994).

A través de algunos ensayos se ha comprobado que usando suero anti-*B. abortus* RB51 (cepa vacunal rugosa) se obtiene mayor protección que la proporcionada por las células inmunes en el control de la infección por *B. ovis* (Jiménez de Bagués *et al.*, 1994). El predominio de los isotipos IgG2a e IgG3 en ratón permitiría inferir que *B. ovis* induce la población de linfocitos T colaboradores del tipo 1 (LTh1) productores de interferón γ (Jiménez de Bagués, *et al.*, 1994).

ACTIVIDAD DE CD4 EN LA RESPUESTA INMUNE

La principal función del sistema inmune es el reconocimiento y subsecuente eliminación de antígenos extraños, formación de memoria inmunológica y el desarrollo o tolerancia de los antígenos propios (Luckheeram, *et al.*, 2012).

Los linfocitos T, son células que se producen en la médula ósea y migran al timo en donde maduran y son seleccionados. Una vez en el timo proliferan una gran cantidad de células T generadas, originando una enorme diversidad de éstas a causa de reordenamientos aleatorios de genes de TCR; se generan más de 10¹¹ tipos de células al azar, pero muchos de los que se unan a antígenos propios serán eliminados, por tanto cerca del 95% son eliminados o inactivados (Penn, 2002).

Después de ser activados y diferenciados, cumplirán un papel importante en la respuesta inmune a través de la secreción de citocinas. Las células T CD4 tienen una cantidad importante de funciones, que van desde la activación de células del sistema inmune innato, B linfocitos, células T citotóxicas, así como su interacción con células no inmunes, y también tienen un rol crítico en la supresión de la reacción inmune (Luckheeram, *et al.*, 2012).

El paso inicial para su diferenciación es la estimulación antigénica que resulta de la interacción de TCR y CD4 como co-receptor con el complejo antigénico MHC II presentado por una célula profesional presentadora de antígenos (APC) (Luckheeram, *et al.*, 2012).

ACTIVIDAD DE CD8 EN LA RESPUESTA INMUNE

El timo provee un microambiente con la combinación de células del estroma, citocinas y quimosinas para la generación de células T funcionales de sus precursores (Timocitos). El gen de receptor de células T (TRC) y el arreglo y selección de los timocitos son críticos para el desarrollo de linfocitos T maduros capaces de reconocer un infinito margen de antígenos, durante el paso a este microambiente y el contacto con el complejo MHC con las APC's juegan un papel determinante para que en el marco del repertorio de reconocimiento de

células T se seleccionen las moléculas de superficie que se expresaran tales como CD4 y CD8.

Los linfocitos T CD8 son los encargados de desplegar la actividad citotóxica que provocará apoptosis en células infectadas por algún patógeno (Luckheeram, Zhou, Verma, & Xia, 2012). Esta acción se realiza una vez que es identificada una célula infectada por el linfocito T CD8, así proliferaran los linfocitos T CD8 y sus clones buscarán y eliminarán a otras células que presenten al antígeno extraño (Penn, 2002).

ACTIVIDAD DE LINFOCITOS T $\gamma\delta$ (WC1) EN LA RESPUESTA INMUNE

Al parecer entre las funciones de estos linfocitos T $\gamma\delta$ se encuentra el reconocimiento de células blanco, la citolisis puede ser llevada a cabo por citolisis celular dependiente de anticuerpos, lisis tumoral y la restringida al MHC; en el primer caso los linfocitos reconocen epitopos sobre el fragmento Fc de las IgG que se encuentran sobre células blanco tumorales; también se ha sugerido que pueden reconocer proteínas de estrés bacterianas en presencia de APC como linfocitos B, y también reconocen células propias dañadas a través del MHC I y MHC II (Baldwin, *et al.*, 2014).

WC 1 se refiere a un multigene altamente polimórfico que se expresa exclusivamente en $\gamma\delta$ células de linfocitos T; primero fue descrito en ovejas. Al parecer WC1 se involucra en la activación de linfocitos T $\gamma\delta$ (Baldwin, *et al.*, 2014).

AUTOINMUNIDAD

El estrés oxidativo en el aparato reproductor del carnero activa vías de defensa celular que pueden dañar el tejido y provocar una reacción autoinmune en el tracto reproductor se ha observado que la estimulación antigénica para el reconocimiento de espermatozoides puede ser espontánea sin tener un sitio de estimulación antigénica claro, lo anterior se ha tratado de atribuir a anormalidades estructurales o historia de traumatismos en esa región, siendo un factor promotor de lesiones en el tracto del macho al dañar la barrera hemato-testicular (Vasselon y Detmers, 2002).

En las infecciones causadas por *B. ovis* el infiltrado alrededor del lumen de los túbulos del epidídimo se producen en respuesta a los antígenos bacterianos de *B. ovis*, al fluido seminal o a los espermatozoides (Foster, 1988; Foster, *et al.*, 1988). La presencia de respuesta antiespermática ya fue demostrada en casos de epididimitis experimental por *A. seminis* y *B.*

ovis y se considera un componente de importancia en la inducción de las lesiones epididimarias (Paolicchi, et al., 2000; Cuevas, 2008).

La exposición de antígenos en la mucosa epididimal y los desechos espermáticos expuestos al sistema inmune determinan el establecimiento de respuestas de tipo autoinmune que inducen cuadros de lesión, crónicos e irreversibles, estos son caracterizados por la formación de granulomas espermáticos en cuyo caso la respuesta generada por el organismo como medio de defensa ocasiona como ya se mencionó daños irreversibles afectando la fertilidad de los carneros con infección de *B. ovis* (Carvalho, et al., 2012).

INMUNIDAD DE MUCOSAS

Los tejidos genitales de hembras y machos son portales de entrada para agentes infecciosos en enfermedades de transmisión sexual, y aunque los tractos genital e intestinal son considerados como componentes del sistema mucosal inmune, tienen características remarcablemente diferentes (Mestecky, et al., 2010).

Funcionalmente el sistema inmunológico de las mucosas puede ser dividido en dos regiones: sitios de inducción y sitios efectores de la respuesta inmune. Los sitios inductores tales como las tonsilas y las placas de Peyer, son los lugares donde los antígenos se comienzan a procesar para la respuesta inmune. En tanto que la lámina propia del intestino, la submucosa del pulmón y el tracto gastrointestinal, las glándulas salivales, lacrimales y mamarias, conforman los sitios efectores. Los linfocitos antígeno-activados migran de los sitios de inducción a los sitios efectores para proteger al organismo de las agresiones externas (Mesquita, et al., 2010).

El organismo se encuentra protegido del ambiente externo por dos capas claramente identificadas, por un lado una capa de epitelio queratinizado de la piel y por otra capas no queratinizadas o epitelios húmedos denominados mucosas; los factores inmunes innatos y adquiridos juegan un papel importante en la integridad del organismo a lo largo de la superficie de las mucosas.

El tejido linfoide asociado a las mucosas recibe diferentes denominaciones, el tejido linfoide encontrado a lo largo del tracto respiratorio se puede dividir en tejido linfoide asociado a la cavidad nasal (NALT) y tejido linfoide asociado a los bronquios (BALT). El tejido encontrado en el tracto gastrointestinal se denomina tejido linfoide asociado al intestino (GALT). En cuanto al aparato reproductor, el tejido linfoide asociado al aparato reproductor en raras ocasiones se denomina RALT y ha sido poco explorado.

Dado que mucho del tejido linfoide asociado a las mucosas (MALT) se encuentra difusamente esparcido y existen diferencias entre las especies, la organización del MALT no se encuentra completamente descrita (Bailey, *et al.*, 1985; Mesquita, *et al.*, 2010).

Posterior a la exposición inicial de algún antígeno (Ag) en el MALT, los linfocitos dejan los sitios de inducción y se dirigen a sus sitios efectores en las mucosas. El camino que resulta en la inmunidad en varias mucosas se denomina Sistema Inmune Común de las Mucosas (Lun, *et al.*, 2007).

Los linfocitos B que se encuentran en los sitios de inducción desarrollan principalmente células plasmáticas productoras de IgM, que emigran a los sitios efectores ubicados en la lámina propia. Las señales proporcionadas por las células T y las células presentadoras de antígenos (CPAs) en el MALT, provocan el cambio de isotipo hacia la producción de IgA. Los receptores en los linfocitos provenientes del MALT que reconocen a moléculas de los endotelios de las mucosas, aseguran que estos linfocitos migren a las mismas. Estas moléculas de los linfocitos se denominan receptoras del *homing* y las moléculas que los linfocitos reconocen en el endotelio son llamadas adhesinas vasculares (Mcghee y Kiyono, 1999) (Mesquita, *et al.*, 2010).

A diferencia del aparato reproductor de la hembra, sobre las que se han realizado numerosos estudios referidos a la magnitud y las propiedades de los anticuerpos presentes, la respuesta inmune en el aparato reproductor masculino ha sido poco explorada (Moldoveanu, *et al.*, 2005).

El tracto genital masculino cumple con funciones de defensa contra antígenos y por otro lado debe tolerar a las células germinales que presentan antígenos diferenciales (Anderson y Pundney, 1999).

El estudio comparativo de la distribución y propiedades moleculares de los anticuerpos séricos y los de las secreciones del tracto reproductor en machos muestra que se asemejan más a los encontrados en el suero que a las características típicas de una secreción de mucosa. En contraste con la saliva, la leche y el moco intestinal donde la S-IgA es dominante y donde pIgA sin SC (pieza secretoria) y mIgA (IgA monomérica) están presentes en cantidades trazas, el plasma seminal posee como isotipo dominante a la IgG y niveles comparables de las tres formas de IgA (sIgA, pIgA y mIgA). Moldoveanu *et al* (2005), reportaron que solo el 50% de la IgA polimérica aparece como sIgA en el plasma seminal, lo que podría deberse a la digestión de la pieza secretoria (SC) por las proteasas presentes en abundancia en el plasma

seminal; en los humanos, la composición de las secreciones preeyaculatorias se asemeja a las de las secreciones externas típicas (Moldoveanu, *et al.*, 2005).

Existen factores presentes en el semen o en las secreciones vaginales que les pueden conferir actividades inhibitorias o estimulantes del desarrollo bacteriano o les permiten influir sobre la respuesta inmune; de manera que en el plasma seminal en humanos y verracos se ha informado de una fracción inmunosupresora de la respuesta inmune celular y humoral y prostaglandina del grupo E y transglutaminasa que podrían estar implicadas en la supresión de células NK y de la proliferación linfocitaria (Dostál, 1995; Dostál, 1997).

La información de la respuesta inmune local en el aparato reproductor es escasa, sin embargo se sabe que principalmente es mediada por sIgA y además de Igs; también son pocos los reportes sobre la presencia de células productoras de inmunoglobulinas en los órganos reproductivos y los que cuantifican las distintas subclases de inmunoglobulinas en las glándulas anexas. Existen estudios se reportan una respuesta inmune de sIgA en glándulas anexas del ámpula del conducto deferente (Foster, 1988; Foster, *et al.*, 1988).

Así mismo se han reportado pequeñas diferencias en las concentraciones totales de IgG e IgM en carneros normales comparado con carneros infectados con *B. ovis*, por ejemplo se reportó que IgG1 resultó presente una mayor concentración en los carneros infectados respecto a los sanos, tanto en semen como en secreciones de de las glándulas anexas, así mismo en el caso de la concentración de IgA en el semen y en secreciones de glándulas anexas, también se observó un concentración mayor que la encontrada en el suero y además de ser mayor su concentración que la observada para otros isotipos de inmunoglobulinas, lo que podría indicar la transferencia activa de IgA esta inmunoglobulina al tracto reproductor. Otra localización de células contenedoras de IgA fueron las glándulas bulbouretrales, pero en este caso no existieron diferencias entre los animales controles y los infectados. (Foster, *et al.*, 1988). La presencia de linfocitos B y T, ha sido descrita en los casos de granulomas espermáticos con distintos grados de maduración, se reportaron células contenedoras de inmunoglobulinas (ICC) de los isotipos (IgG, IgM e IgA), siendo las IgG las más abundantes en los granulomas intermedios, así mismo se observó que la presencia de ICC decrece con la edad del granuloma tanto para IgG e IgM, lo que coincide con el número de linfocitos CD4 presentes, estos linfocitos T cooperadores estimulan la transformación de las células B en células plasmáticas. Esta disminución no se observa para el caso los linfocitos citotóxicos CD8 (Saravanamuthu, *et al.*, 1991).

JUSTIFICACIÓN

La epididimitis infecciosa de los carneros causada por *B. ovis*, es una enfermedad económicamente importante en México, ya que causa subfertilidad en los carneros afectados, además de gastos por sacrificio de los animales afectados (Kimberling, 1987; Estein, 1999; Carvalho, *et al.*, 2012).

El diagnóstico de la infección de *Brucella ovis*, requiere la correlación de pruebas serológicas, historia clínica del rebaño, examen clínico y examen andrológico (semen) (Plant, *et al.*, 1986).

Para mejorar el control de la enfermedad es importante realizar estudios de la respuesta inmune que permitan aumentar el conocimiento de la enfermedad y brinde alternativas de acción contra la infección de la *B. ovis*.

Se sabe de cambios patológicos producidos por la *B. ovis*, sin embargo aún no se conoce totalmente su relación con la respuesta inmune.

Por todo ello es importante desarrollar investigaciones encaminadas a conocer a más de la patogenia, así como los diferentes métodos de diagnóstico, y los cambios patológicos que pueden desarrollarse en los animales expuestos a la *B. ovis*, y hacer un seguimiento de la respuesta inmune de la enfermedad.

HIPÓTESIS

Los carneros infectados experimentalmente con *B. ovis* por vía mucosal y endovenosa desarrollan una respuesta inmune humoral y celular, así mismo *B. ovis* causa el desarrollo de lesiones anatomopatológicas en los órganos del aparato reproductor.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar en carneros desafiados experimentalmente con *B. ovis* la respuesta inmune humoral y celular y los efectos patológicos sobre órganos del aparato reproductor.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Reproducir la epididimitis causada por *B. ovis* a través de su inoculación por vías mucosal, y por vía endovenosa.
2. Determinar la presencia de anticuerpos contra *B. ovis* en carneros desafiados experimentalmente usando pruebas serológicas inmunodifusión doble en gel (IGDA), y ELISA.
3. Evaluar los cambios anatomopatológicos causados por la infección de *B. ovis* en los órganos del aparato reproductor.
4. Determinar los cambios en la distribución hemática por citometría de flujo de linfocitos CD4, CD8, linfocitos T γ/δ en carneros desafiados con *B. ovis* por vía prepucial y conjuntival, y vía endovenosa.

MATERIALES Y METODOS

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 presentaran 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 $3,9 \times 10^9$ 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. La cepa que se utilizó para el desafío de los animales es un aislamiento de campo Zacatecas México (01Zac-INIFAP), donada por el Dr. Efrén Díaz Aparicio.

PREPARACIÓN DEL INÓCULO PARA DESAFIO

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 y se estandarizó a una concentración de $3,9 \times 10^9$ UFC/mL.

El manejo del inóculo en los carneros fue de la siguiente manera: La inoculación por la vía prepucial se realizó aplicando un instilación prepucial se realizó en la introducción del inóculo usando una jeringa sin aguja y posteriormente un masaje con el cierre de la abertura prepucial, administrando 0,5 mL con una suspensión de la bacteria a razón de $3,9 \times 10^9$ UFC/mL de *B. ovis* y la instilación conjuntival de lado izquierdo se realizo a través de la instilación de 0,5 mL de la misma suspensión conteniendo aproximadamente $3,9 \times 10^9$ UFC/ml.

A los animales del grupo control se les aplico 0,5 mL solución salina por lavado prepucial y 0,5 mL de solución salina en la conjuntiva.

Los animales se mantuvieron aislados en corrales con los animales de cada grupo.

Los animales del grupo endovenoso, recibieron 1 ml de la suspensión mencionada por vía endovenosa con un contenido de $3,9 \times 10^9$ UFC/ml. (Carvalho, *et al.*, 2012).

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 (Carvalho, *et al.*, 2012).

Semanalmente, se realizó un examen clínico del aparato genital, incluyendo la medida de la circunferencia escrotal en el diámetro mayor de los testículos registrando las modificaciones encontradas y se describieron las lesiones y su ubicación en el testículo y en el epidídimo afectado.

EVALUACIÓN DE CANTIDAD DE EYACULADO

Durante las evaluaciones clínicas y la evaluación de la circunferencia escrotal, también se tomaron muestras de semen mediante la utilización de un electro eyaculador, y evaluar la cantidad de eyaculado.

TOMA DE MUESTRAS

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.

A los carneros se les practicó eutanasia (Carvalho, *et al.*, 2012), el sacrificio de los animales se realizó como lo establece la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (SAGARPA) en la Norma Oficial Mexicana 033 (Profepa, 2016). Previa electro insensibilización a los 189d 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 (Nicrom GmbH, HM 325, Alemania), de 5 µm de espesor que se tiñeron con hematoxilina y eosina.

OBTENCIÓN DE SUERO

La toma de muestras para la obtención del suero se realizó colectando por vía yugular 3 a 4 mL de sangre en tubos vacutainer sin coagulante, las muestras se mantuvieron 24 horas a temperatura ambiente y después de ese tiempo se procedió a centrifugar a 100 g durante 5 minutos para posteriormente separar el suero de la muestra, finalmente el suero fue congelado a -73°C hasta el momento de procesarse para las pruebas serológicas.

EXTRACCIÓN DE SANGRE PARA OBTENCIÓN DE LINFOCITOS

Se recolectaron de la vena yugular 3 a 4 mL de sangre en tubos vacutainer con EDTA, posteriormente los tubos sufrieron movimientos suaves de 5 a 10 veces para permitir que la sangre se mezclara con el anticoagulante y así evitar la formación de coágulos, las muestras se almacenaron a 4° C para su transporte al laboratorio (Marion, 2007).

MUESTRAS PARA HISTOPATOLOGÍA

A los carneros se les practicó eutanasia a los 189 d, previamente fueron insensibilizados como marca la Norma Oficial 033 (Profepa, 2016).

Las muestras para el proceso de Histopatología se tomaron al momento del sacrificio de los animales para lo que se colectaron tejidos de 2cm² de los siguientes órganos:

Epidídimo (cabeza, cuerpo y cola derechos e izquierdos), testículo izquierdo y derecho en la zona de la rete testis –medula- y de la zona cortical, glándula seminal, ámpula, uretra pélvica, glándula bulbouretral, membrana nictitante izquierda y ganglio linfático inguinal.

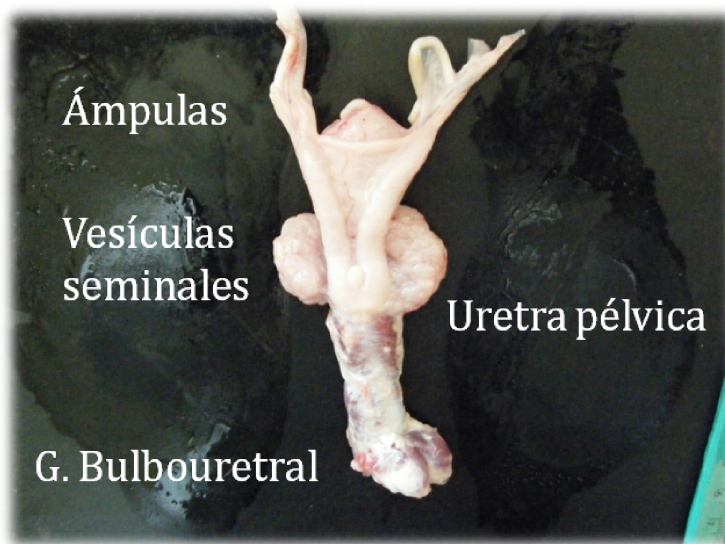


Figura 1. Imagen de las glándulas anexas del aparato reproductor del carnero.

Posteriormente los órganos se colocaron en frascos de formol al 10% a excepción de los testículos que se colocaron en solución de Bouin, y se conservaron para su proceso histológico y tinción en H y E.

Para la realización de estudios bacteriológicos fueron tomados en condiciones estériles transportadas inmediatamente al laboratorio maceradas con SSF en bolsa estéril y cultivados en Agar Sangre y Agar Sangre Skirrow en condiciones micro aerofílicas durante siete días (Paolicci, *et al.*, 2013).

MUESTRAS PARA AISLAMIENTO DE *Brucella ovis* EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

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 7d (Paolicci, *et al.*, 2013).

Una vez que los carneros recibieron eutanasia, de los órganos obtenidos para los estudios de Histopatología, se tomaron muestras de los mismos órganos en condiciones estériles y fueron transportados inmediatamente al laboratorio de bacteriología del CIESA donde fueron maceradas con SSF en bolsa estéril y cultivados en agar sangre y agar sangre Skirrow en condiciones de microaerofilia durante siete días para el aislamiento de *Brucella ovis* (Paolicci, 1991).

PCR PARA LA DETERMINACIÓN 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 µL de semen, una vez completada la extracción se suspendió el ADN en 25 µL 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'). 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 µg/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.

De las muestras de semen se extrajo el DNA para lo que se utilizó el kit comercial Kapa express extrac (KAPABIOSYSTEMS, Boston Massachusetts USA), se siguieron las instrucciones del fabricante utilizando para la extracción de DNA 8 µl, una vez completada la extracción se suspendió en 25 µl de TE Buffer y se almaceno a -20°C hasta el procesamiento para la prueba de PCR.

Tabla 1. Técnica de extracción de DNA de muestras de semen.

Componente	Volumen/reacción	Temperatura y tiempo
10x buffer de extracción Kappa exprés	10 µl	
Enzima de extracción Kappa	2 µl	
Muestra (semen)	8 µl	
Lisis incubación termociclador		75°C por 15 min.
Inactivación por calor		95°C por 5 min.
Vortex		3 seg.
Dilución en buffer TE y almacén		-20°C

La prueba de PCR se realizó utilizando un Kit comercial de (KIAGEN, Alemania), los iniciadores para la amplificación de los fragmentos de DNA se realizaron de acuerdo a lo reportado por (Saunders *et al.*, 2007), las especificaciones de los iniciadores se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Iniciadores usados en la prueba de PCR para el diagnóstico de *B. ovis*

Especie	Iniciador	Secuencia iniciador(5'-3')	Producto Final (pb)
<i>Brucella ovis</i>	ISP1	GGTTGTTAAAGGAGAACAGC	690
	ISP2	GACGATAGCGTTTCAACTTG	

El volumen final para la reacción fue de 25 μ l y se constituyo como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Volúmenes utilizados para la prueba de PCR.

Componente	Volumen/Reacción
2Xqiagen PCR Master Mix	12.5 μ l
Iniciadores	
ISP1	0.5 μ l
ISP2	0.5 μ l
5xQ-solución	5 μ l
Muestra DNA	1 μ l
H2O libre de RNasas	6 μ l
Volumen final	25 μ l

La reacción de la prueba de PCR (Tabla 4), se realizó con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de a 96°C durante 10 minutos, 35 ciclos con las etapas de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineación a 57°C durante 60 segundos y extensión de la cadena a 72°C durante 60 segundos; finalmente se realizó una extensión final a 72°C durante 6 minutos, y se incubó a 4° C.

Tabla 4. Condiciones para la realización de la prueba de PCR.

Etapas de Reacción	Temperatura y tiempo	Ciclos
Desnaturalización total	96°C por 10 min.	
Desnaturalización	94°C por 30 seg.	35
Alineación	57°C por 60 seg.	
Extensión de la cadena	72°C por 30 seg.	
Extensión final	72°C por 30 seg.	
Incubación	4°C	

Los productos de la PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% preparado en una solución amortiguadora de Tris base 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA (TAE 1X), para la corrida se utilizó como amortiguador la misma solución usando bromuro de etidio a una concentración de 0,5 μ g/mL para visualizar las bandas de DNA con luz UV.

INMUNODIFUSIÓN DOBLE EN GEL (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 (OIE, 2008), en el pozo central se colocaron 30 μ L 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 (Díaz-Aparicio, *et al.*, 2009).

La prueba IGDA utiliza un extracto salino caliente (HS) y los siguientes reactivos: Agar Noble o agarosa de alta calidad, cloruro sódico (NaCl), y tampón borato (preparado con ácido bórico [12,4 g]; cloruro potásico [14,5 g]; agua destilada [1,600 ml]; ajustado a pH 8,3 con una solución de NaOH 0,2 M, y llevado hasta 2,000 ml con agua destilada) (OIE, 2009).

Para preparar los geles, se disuelven 1g de agarosa (o agar Noble), 10 g de NaCl en 100 mL de tampón borato hirviendo mientras se agita continuamente. Cubrir los portaobjetos, colocados sobre una superficie plana, con la cantidad necesaria del gel fundido para formar un lecho de 2,5 mm de profundidad (aproximadamente 3,5 mL para los portaobjetos estándar). Después de que el gel ha solidificado (15-20 minutos), se recortan los pocillos utilizando un punzón para geles. Los pocillos deberán ser de 3 mm de diámetro y separados 3 mm, y estar dispuestos según un patrón hexagonal alrededor de un pocillo central que también tiene 3 mm de diámetro. La técnica se puede adaptar a placas de Petri u otros moldes.

ELISA

Se utilizó el kit de ELISA (CHEKIT BRUCCELLA 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 μ L 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 paca 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.

PROCEDIMIENTO ELISA.

1) *Sueros*: Diluir las muestras de suero problema y los controles positivo y negativo al 1/200 añadiendo un mínimo de 10 µL de suero a 2 ml de PBST. Los sueros controles se colocan por duplicado en los pocillos denominados A1, A2 para el control positivo y A3, A4 para el control negativo. Posteriormente se agregan volúmenes de 100 µL de suero los sueros problemas diluidos en los restantes pocillos hasta completar la placa de microtitulación. Las placas se tapan con papel de aluminio, se incuban a 37°C durante 1 hora y se lavan tres veces con el tampón de lavado PBST.

2) *Conjugado*: El conjugado titulado se diluye en PBST, se añade en los pocillos (100 µl) y la placa se tapa y se incuba durante 1 hora 37°C. Después de la incubación las placas se lavan de nuevo tres veces con PBST.

3) *Substrato*: Se añade a las placas la solución de ABST en tampón de sustrato (100 µl/pocillo) y las placas se incuban durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación continuada.

4) *Solución de paro*: Se detiene la reacción agregando 100µL de la solución de paro

5) *Lectura e interpretación de los resultados*: La absorbancia se lee automáticamente en un espectrofotómetro, lector de placas de ELISA, en el filtro de 405 nm. El lector está conectado a un equipo de computo un softwear suministrado por el fabricante del Kit, que aplica las

formula correspondiente dando un valor en porcentaje que permite clasificar las muestras en positivos, sospechosos y negativos, debajo.

$$\text{Valor de la muestra en \%} = \frac{\text{DO de la Muestra} - \text{DO del Control Neg.}}{\text{DO del Control Pos.} - \text{DO del Control Neg.}} \times 100\%$$

$$\text{DO del Control Pos.} - \text{DO del Control Neg.}$$

Tabla 5. Valores de interpretación en prueba de ELISA.

Valor	<10%	≥10% a 50%	≥50%
Interpretación	Negativo	Sospechoso	Positivo

Valores de referencia para la interpretación

La prueba se considera válida cuando la diferencia entre los promedios de los controles positivo y negativo es $\geq 0,3$ de densidad óptica (DO) y los controles positivos no exceden de 2,0 de DO y los negativos no sobrepasen los 0,5 de DO.

DETERMINACIÓN DE POBLACIONES LINFOCITARIAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Para la evaluación de linfocitos por citometría de flujo, se tomaron entre 4-5 mL de muestras de sangre utilizando tubos vacutainer con EDTA como anticoagulante; posteriormente las muestras se llevaron al laboratorio y se mantuvieron a 4 °C para prepararse y llevar a cabo su lectura por citometría de flujo.

Previo a la lectura de citometría de flujo las muestras se manejaron de la siguiente manera:

De las muestras de sangre se tomaron 500 μL de sangre y se diluyeron con 500 μL de una solución de PBS-BSA, posteriormente esta dilución se agregó a un tubo previamente preparado con 3 mL de lymphoprep a 4°C; una vez en el tubo con lymphoprep las muestras se centrifugaron a 80 g durante 20 minutos. Durante ese tiempo se prepararon tubos con 2 mL de PBS-BSA a 4 °C para recibir los linfocitos separados con una pipeta de 1000 μL (re-suspensión de linfocitos en PBS-BSA) y se homogenizaron; de nueva cuenta se centrifuga la muestra a 80 g durante 5 minutos y el sobrenadante se desecha, posteriormente se re-suspende en 400 ml de PBS-BSA a 4°C y se homogeniza con vortex por 5 segundos, se conserva en formol al 1% A razón de 1:1, y se almacenan hasta llevar a lectura de citómetro.

Para la lectura en citómetro se tomaron las muestras y se les agregó 1000 μL de PBS-BSA a 4°C para enjuagar la muestra, y se centrifugó por 5 minutos a 80 g, se decanta el sobrenadante y se re-suspende con 400 ml de PBS-BSA a 4°C . De esta muestra se toman 10 μL de células y se llevan a 200 μL de PBS-BSA a 4°C en caja de cultivo celular, se centrifugó a 300 g durante 5 minutos, al término de los cuales se decanta el sobrenadante, a éste se agregó 5 μL del anticuerpo y se mantiene durante 30 minutos en refrigeración y a oscuridad, al término de los 30 minutos se agregó 250 μL de PBS-BSA a 4°C y se centrifugo durante 5 minutos a 4°C , se decantó el sobrenadante y se re-suspendió la muestra con 150 μL de PBS-BSA a 4°C , y las muestras se pasaron a tubos de citometría de flujo para posteriormente leerse en citómetro de flujo.

El citómetro de flujo utilizado es FACSCalibur (Becton Dickinson, USA), equipado con un láser de iones de Argón con una onda de luz de 488nm. Para la estandarización de las lecturas se usaron perlas (BD bioscences) y tubos sin tinción y con cada uno de los marcadores.

En la tabla 6, se muestran los marcadores utilizados para la determinación de poblaciones de linfocitos.

Tabla 6. Marcadores usados para la determinación de poblaciones de linfocitos.

Anticuerpo/Clon	Especificidad	Formato	Isotipo	Descripción	Laboratorio
CD4	CD4	Alexa Fluor	IgG2 α	Mouse anti sheep	Serotec
CD8	CD8	RPE	IgG2 α	Mouse anti sheep	Serotec
WC1	Lymphocyte $\gamma\delta$	FITC	IgG1	Mouse antisheep	Seotec

Características de los diferentes anticuerpos que se utilizaron para correr las pruebas de citometría de Flujo.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con la información recabada se elaboró una base de datos para su análisis estadístico mediante las metodologías de 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 $\alpha < 0,05$ (Faraway, 2006) (Littell, *et al.*, 1998).

El análisis estadístico de los datos del ensayo experimental se realizó a través de la metodología de mediciones repetidas utilizando el modelo de efectos fijos y las diferencias entre grupos ($\alpha=0,05$) se establecieron mediante medias de mínimos cuadrados (Littell, *et al.*,

1998). Además, en cada grupo, se determinó los coeficientes de regresión lineal (β_0 y β_1) para cada una de las inmunoglobulinas analizadas.

Para el análisis de las Medias de Intensidad de Fluorescencia obtenidas por citometría de flujo se utilizó una prueba t de series apareadas. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos. Se empleó el Software InfoStat <http://www.infostat.com.ar/>.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Para el diseño experimental se realizó la toma de muestras, según el grupo al que pertenecía cada carnero (Figura 2).



Figura 2. Diseño experimental: grupos experimentales.

En el laboratorio, una vez tomadas las muestras para citometría de flujo, se hizo el manejo de las mismas como se muestra en la Figura 3.

Análisis de respuesta inmune por citometría de flujo

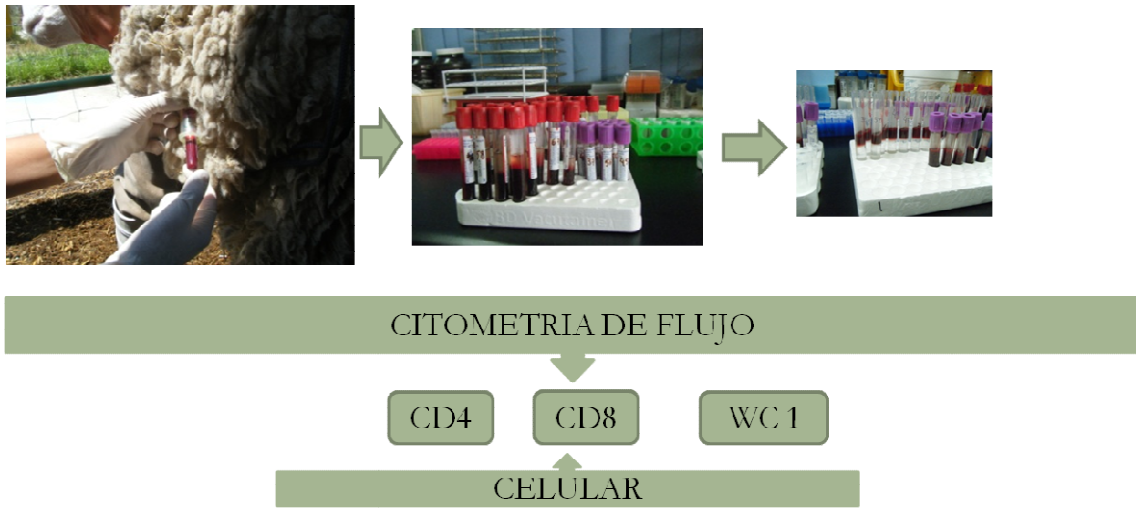


Figura 3. Diseño experimental: Análisis de respuesta inmune por citometría de flujo.

Las muestras para el desarrollo de las pruebas serológicas se desarrollo como se muestra en la Figura 4.

Pruebas serológicas



Figura 4. Diseño experimental: Pruebas serológicas.

En la Figura 5, se muestra la línea de tiempo del trabajo experimental.

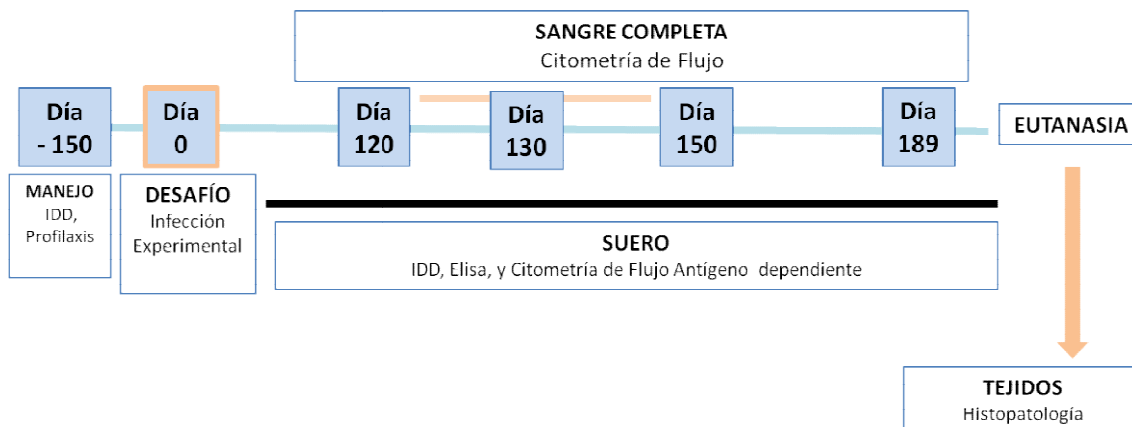


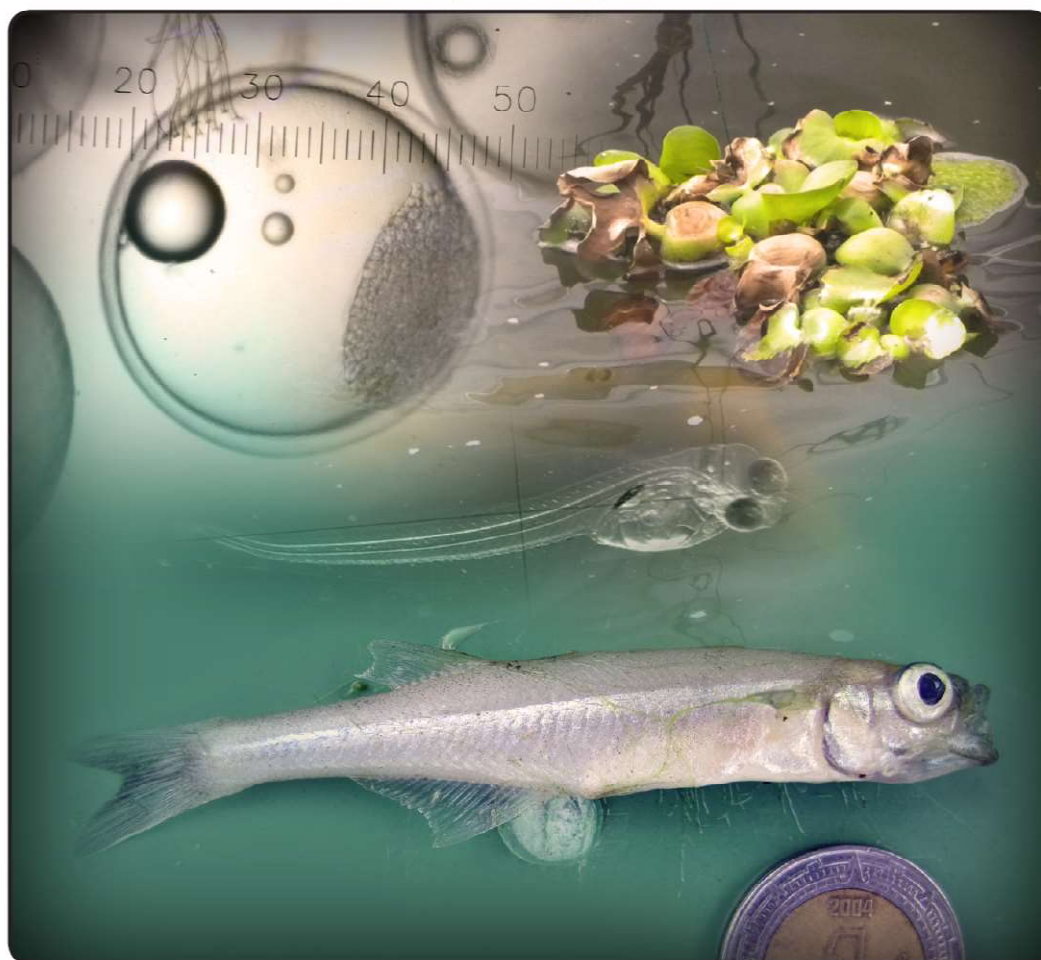
Figura 5. Línea de tiempo para el trabajo experimental.

RESULTADOS

Revista Electrónica:
Depósito Legal: ppi 201502ZU4665 // ISSN electrónico: 2477-944X
Revista Impresa:
Depósito Legal: pp 199102ZU46 / ISSN 0798-2259



MARACAIBO, ESTADO ZULIA, VENEZUELA



Vol. XXVIII (3), Mayo - Junio, 2018

REVISTA CIENTÍFICA

Fundada en 1990

Universidad del Zulia
Facultad de Ciencias Veterinarias
Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela

Vol. XXVIII (3)
Mayo - Junio, 2018

MIEMBROS FUNDADORES
José Fariá R. (+)
Mario Pérez B.
Manuel Alvarado M.

DIRECTOR FUNDADOR
Rafael César Reátegui Cárdenas (+)

EDITOR JEFE
Mario Pérez Barrientos

EDITOR ASOCIADO
Trohadio Muñoz Díaz

COMITÉ EDITOR
María Piñero
Disney Pino
María Flena Peña
Armando Quintero
Roger Ramirez

COORDINADORA DE EDICIÓN
María Esperanza Ferrer Fuenmayor

SECRETARIA EJECUTIVA
Marilyn Del V. Añez Davila

DISEÑO GRÁFICO
Alonso Eleazar Flores Rondón

OFICINISTA
Carmen Ferrer Mármol

La edición de esta revista ha sido auspiciada por el Vicerrectorado Académico LUZ, el Sistema de Servicios Bibliotecarios y de Información (Serbiluz) y Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de LUZ (CONDES)

SE AGRADECE CANJE
EXCHANGE DESIRED

DIRECCIÓN:
Revista Científica
Universidad del Zulia,
Facultad de Ciencias Veterinarias
Núcleo Agropecuario Ciudad Universitaria
Apdo. 15252, Maracaibo 4005-A
Estado Zulia-Venezuela
Telf.-Fax: 58-261-4126158
E-mail: revista_fcv@gmail.com
http://www.fcv.luz.edu.ve
<http://produccioncientificalu.org/index.php/cientifica>

El índice Acumulado Anual aparecerá en el último número de cada volumen.
No. 6 Noviembre - Diciembre

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



**UNIVERSIDAD
DEL ZULIA**

Autoridades Universitarias

Jorge Palencia..... Rector
Judith Aular de Durán..... Vicerrectora Académica
Jesús Salón Crespo..... Vicerrector Administrativo
Marlene Primera..... Secretaria

Autoridades de la Facultad de Ciencias Veterinarias

José Manuel Rodríguez..... Decano
Wilfredo Bríñez..... Director Escuela
José Atilio Aranguren..... Director División Postgrado
Nidia Rojas..... Director División Investigación
Enmar Monasterio de Hernández.. Directora División Extensión
William Mejía..... Director Centro Experimental de
Producción Animal (CEPA)
Fanny Gallardo..... Directora Policlínica Veterinaria
Decio González..... Secretario Docente
Jorge Rubio..... Coordinador del Núcleo Rural
Vicente Vilá..... Coordinador Núcleo Grano de Oro
Elvis Martínez..... Coordinador Finca San Pedro

Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico

Gilberto Vizcaino..... Coordinador-Secretario

Portada:

**EVALUATION OF THE USE OF PLANT AND SYNTHETIC
SUBSTRATES IN SPAWNING, EGG VIABILITY AND SURVIVAL
OF FINGERLINGS OF *Chirostoma humboldtianum***
(Págs. 171 - 177)

*La revista no se hace responsable
de los conceptos emitidos por sus autores*

*Prohibida la reproducción total o parcial
del contenido de esta Revista*

© REVISTA CIENTÍFICA, 2018
© FCV, Universidad del Zulia
Revista impresa
ISSN 0798-2259
Depósito Legal: pp 199102ZU46
Revista electrónica
Depósito Legal: ppi 201502ZU4665
ISSN electrónico: 2477-944X

www.luz.edu.ve

REVISTA CIENTÍFICA

REVISTA INTERNACIONAL ARBITRADA DEDICADA A LA DIVULGACIÓN
DE INVESTIGACIONES ORIGINALES EN EL ÁREA AGROPECUARIA

Vol. XXVIII (3)

Mayo - Junio, 2018

EDITORIAL..... Pág.
169

FAUNA SILVESTRE

EVALUATION OF THE USE OF PLANT AND SYNTHETIC SUBSTRATES IN SPAWNING, EGG VIABILITY
AND SURVIVAL OF FINGERLINGS OF *Chirostoma humboldtianum*

**EVALUACIÓN DEL USO DE PLANTAS Y SUSTRATOS SINTÉTICOS EN EL DESOVE, VIABILIDAD DE
HUEVOS Y SUPERVIVENCIA DE ALEVINES DE *Chirostoma humboldtianum***

Gabriela Vázquez-Silva, Fernando Carlos Arana-Magallón, Ramón De Lara-Andrade, Laura Georgina
Núñez-García and Ana Karen López-de la Rosa.....

173

CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

NIVELES DE AFLATOXINAS EN ALIMENTOS BALANCEADOS PARA GALLINAS PONEDORAS Y
POLLOS DE ENGORDE, DISTRIBUIDOS EN GRANJAS AVÍCOLAS DE VENEZUELA (ESTADOS:
ARAGUA, CARABOBO, LARA Y ZULIA)

**AFLATOXIN LEVELS IN FEED FOR LAYING HENS AND BROILER IN FARMS DISTRIBUTED IN
VENEZUELA (STATE: ARAGUA, CARABOBO, LARA Y ZULIA)**

Darwin Arrieta-Mendoza, Elias Rafael Ascanio, Elena del Carmen Briceño, Gema Carolina Maniglia,
Aouiqw Rafael Ascanio, Sergio Alejandro Flores, Gladys Mollero y Maria Pérez-Arevalo.....

180

MEDICINA VETERINARIA

EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE CALENTAMIENTO EXTERNO PARA ATENUAR LA HIPOTERMIA
INTRAQUIRÚRGICA EN FELINOS

**EVALUATION OF TWO EXTERNAL HEATING METHODS TO MITIGATE INTRA-SURGICAL
HYPOTHERMIA IN CATS**

Daniel Uribe-Castillo y Ricardo Andrés Correa-Salgado.....

192

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, Edgardo Soriano-Vargas, Claudia Giovanna Peñuelas-Rivas, Ruy Ortiz-
Rodríguez, Fernando Alberto Paolicchi, Valente Velázquez-Ordoñez, Martín Talavera-Rojas y Jorge
Acosta-Dibarrat.....

199

<p>INTERVALOS DE REFERENCIA PARA LOS PARAMETROS VITALES EN ASNALES Y MULARES DEL SUROESTE DE ANTIOQUIA, COLOMBIA REFERENCE INTERVALS FOR THE VITAL PARAMETERS IN DONKEYS AND MULES FROM SOUTHWEST OF ANTIOQUIA, COLOMBIA Jhonny Buitrago-Mejia, Daniela Rodríguez-Barrera y Juan Pablo Mora.....</p>	208
<p>CÉLULAS DE LINAJE NEURAL PRODUCIDAS POR DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE ADIPOSAS PARA TERAPIA REGENERATIVA EN CANINOS NEURAL LINEAGE CELLS PRODUCED BY DIFFERENTIATION OF ADIPOSE STEM CELLS FOR REGENERATIVE THERAPY IN CANINE Javier Enciso-Benavides, José Amiel-Pérez, Nancy Rojas-Morán y Javier Enciso-Gutiérrez.....</p>	217
<p><i>SALMONELLA</i> PREVALENCE IN POULTRY FARMS OF ECUADOR AND SEROTYPE IDENTIFICATION BASED ON MULTIPLEX PCR SYSTEMS PREVALENCIA DE SALMONELLA EN GRANJAS AVÍCOLAS DE ECUADOR Y SEROTIPIFICACIÓN BASADA EN SISTEMAS DE PCR MÚLTIPLE Yveth Casart, Andrea Natali Díaz Martínez, Mercy Falconí, Alma Koch, Freddy Proaño-Perez e Iván Santiana.....</p>	227
<p><i>PRODUCCIÓN ANIMAL</i></p>	
<p>CONCENTRACIÓN DE TESTOSTERONA INDUCIDA CON GnRH EN TOROS BRAHMAN Y SU RELACIÓN CON EL PERÍMETRO ESCROTAL, TIEMPO DE REACCIÓN Y NÚMERO DE SERVICIOS TESTOSTERONE CONCENTRATION INDUCED WITH GnRH IN BRAHMAN BULLS AND ITS RELATIONSHIP TO SCROTAL CIRCUMFERENCE, REACTION TIME AND NUMBER OF SERVICE Néstor Alonso Villa y Alejandro Ceballos.....</p>	235

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 Toluca-Atzacomulco, 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 carnero¹ grupo¹ 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 descender ($P<0,05$). 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). Ram¹ group¹ 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 esperma. 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 presentaron 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* via

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 a 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, ampulas 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 micrótomos (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 microaerófilas 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, 0,5 µL de cada iniciador, 5 µL de 5xQ-solution, 6 µL de H₂O libre de RNasas y 1 µL 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 Etíldio (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 XChex 3.3 (IDEXX, Maine, EUA), mismo que proporciona valores (%) que permiten clasificar las muestras en positivos (≥ 50%), sospechosos (≥10% a 50%) y negativos (<10%). La prueba se consideró válida cuando la diferencia entre los promedios de los controles positivo y negativo fue ≥ 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	ID	Serología		Testículo		Epidídimo Derecho			Epidídimo Izquierdo		
		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 inmunoadsorción 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 careros del grupo control se mostraron

202

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 careros infectados vía mucosas como en el grupo de careros IE con *B. ovis* vía endovenosa. Mientras que la prueba de IGDA, detectó 83,3 y 66,6% de careros 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).

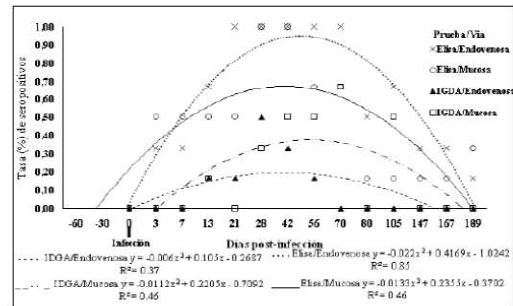


FIGURA 1. COMPORTAMIENTO DE LAS PRUEBAS SEROLÓGICAS (ELISA VS IGDA) PARA LA DETERMINACIÓN DE SEROPOSITIVIDAD DE EN BORREGOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON *Brucella ovis* DE ACUERDO CON LA VÍA DE INFECCIÓN (MUCOSA O ENDOVENOSA) Y LOS DÍAS POST-INFECCIÓN.

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 subsiguientes 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 subsiguientes presentaron seropositividad a *B. ovis*.

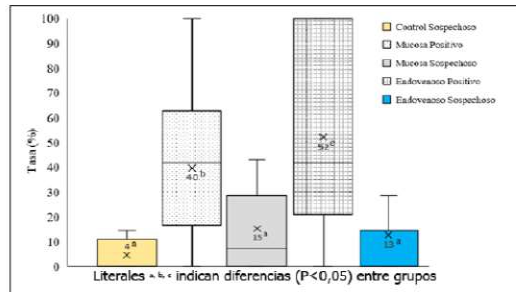


FIGURA 2. COMPORTAMIENTO DEL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE *Brucella ovis* MEDIANTE LA PRUEBA DE ELISA DE ACUERDO CON LA VÍA DE INFECCIÓN (MUCOSA O ENDOVENOSA).

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.

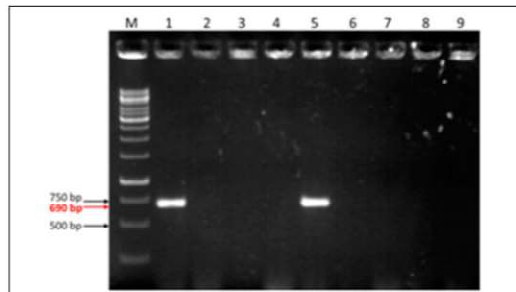


FIGURA 3. PCR PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Brucella ovis* EN SEMEN: M MARCADOR DE PESO MOLECULAR; LÍNEA 1 CONTROL POSITIVO; LÍNEA 2 CONTROL NEGATIVO; LÍNEA 5 MUESTRA POSITIVA; LÍNEAS 3, 4, 6, 7, 8, 9 MUESTRAS NEGATIVAS.

HALLAZGOS PATOLÓGICOS

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

204

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.

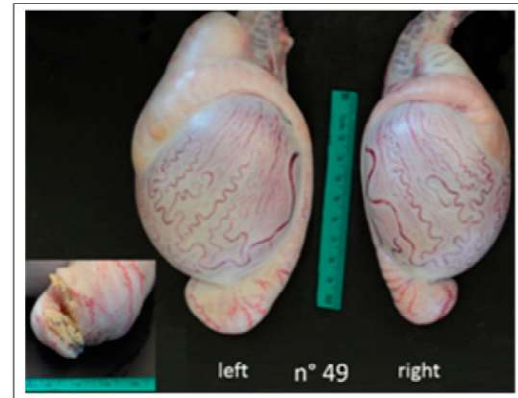


FIGURA 4. LESIONES MACROSCÓPICAS EN EL CARNERO 49, SE OBSERVA EN LA COLA DEL EPIDÍDIMO IZQUIERDO LA PRESENCIA DE EXUDADO CREMOSO E INCREMENTO DE TAMAÑO EN CABEZA, CUERPO Y COLA DEL EPIDÍDIMO.

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 transcurrieron 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 mucosa (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. ovis*, 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. ovis* puede realizarse a través de la demostración de las lesiones típicas en aparato reproductivo, pruebas serológicas y por aislamiento de *B. ovis* 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. ovis* 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. ovis* 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. ovis* 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 *B. ovis* en los programas de control y erradicación de la epididimitis del carnero por *B. ovis* [23].

En este estudio, también se observó ($P < 0,05$), la presencia de carneros sospechosos a *B. ovis* 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. ovis* 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. ovis* 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. ovis* 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 contrajo 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.; MEGIDI, 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.; SANTANA, 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.

De: Felipe San Martín H. <revistasinvestigacion@unmsm.edu.pe>

Enviado: martes, 16 de octubre de 2018 18:05

Para: Jorge Pablo Acosta Dibarrat

Asunto: [RIVEP] Envío recibido

DR JORGE ACOSTA DIBARRAT:

Gracias por enviarnos su manuscrito "DETERMINACION DE LINFOCITOS T CD4, CD8 Y $T\gamma\delta$ EN LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CRÓNICA CON BRUCELLA OVIS" a Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. Gracias al sistema de gestión de revistas online que usamos podrá seguir su progreso a través del proceso editorial identificándose en el sitio web de la revista:

URL del manuscrito:

<http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/veterinaria/author/submission/15353>

Nombre de usuaria/o: ibaraki

Si tiene cualquier pregunta no dude en contactar con nosotros/as. Gracias por tener en cuenta esta revista para difundir su trabajo.

Felipe San Martín H.

Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú

Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú

<http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/veterinaria>

Págs. 713-1071

RIVEP

2018

29: 3

REVISTA DE INVESTIGACIONES VETERINARIAS DEL PERÚ

RIVEP REVISTA DE INVESTIGACIONES VETERINARIAS DEL PERÚ

ISSN: 1609-9117



Vol. 29 N.º 3

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
 Facultad de Medicina Veterinaria
 C.I. Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura
 (IVITA)

RESUMEN

1
2 La epididimitis causada por *Brucella ovis* (*B. ovis*) es una enfermedad infecto contagiosa que causa
3 falla reproductiva y se caracteriza por producir epididimitis, subfertilidad e infertilidad en carneros
4 (*Ovis aries*) afectando la eficiencia reproductiva de los rebaños, causando graves pérdidas económicas.
5 El objetivo de este estudio fue determinar la distribución en sangre de linfocitos T CD4, CD8, LT $\gamma\delta$
6 (WC1) en carneros con infección experimental crónica con *Brucella ovis*. En este trabajo fueron
7 utilizados 18 carneros de 1 a 4 años y libres de *B. ovis*; que se distribuyeron en tres grupos: Grupo 1
8 ($n=6$): control, Grupo 2 ($n=6$), inoculación en mucosas con *B. ovis* y Grupo 3 ($n=6$) inoculación vía
9 intravenosa con *B. ovis*. Se realizó el seguimiento serológico desde el día de la inoculación hasta el
10 189 dPI (día post inoculación). Se inmunotipificaron las poblaciones de linfocitos CD4 y CD8 a los
11 120, 150 y 189 y de WC1 (linfocitos T $\gamma\delta$) a los 120 dPI por citometría de flujo. Por otra parte, a partir
12 del tercer dPI comenzaron a seroconvertir, a los 21 y 28 días todos los animales de los grupos
13 intravenoso y mucosal respectivamente, se presentaron positivos. En adición el día 189 dPI el 50% de
14 los animales de los grupos desafiados se presentaron como positivos o sospechosos a la prueba de
15 ELISA. Se encontraron diferencias en las MIF de los linfocitos CD8 en el grupo control y el grupo
16 endovenoso ($p<0,05$) a los 120dPI, con medias de 1027,4 y 499,6 respectivamente. Estas diferencias
17 se observaron también entre los carneros del grupo control, el grupo mucosal y el grupo endovenoso
18 para las MIF de los linfocitos CD4 ($p<0,05$) a los 189 dPI. Las poblaciones linfocitarias T $\gamma\delta$ (WC1) a
19 los 120 dPI presentaron diferencias en MIF entre el grupo control y el grupo mucosal y el endovenoso
20 ($p<0,05$). *Brucella ovis*, puede modular la respuesta inmune del hospedero, linfocitos CD4 y CD8 son
21 importantes para la defensa del hospedero ante la infección causada por *B. ovis*, las poblaciones tanto
22 de CD4 como CD8 pueden fluctuar a lo largo de la infección por *B. ovis*. La participación de los
23 linfocitos T $\gamma\delta$ podría ser un factor importante en el control de la infección causada por *B. ovis*.
24 **Palabras clave:** Carneros, Epididimitis ovina, *Brucella ovis*; Linfocitos T, ELISA, Citometría de flujo.

ABSTRACT

1 Epididymitis caused by *Brucella ovis* (*B. ovis*) is a contagious infectious disease that causes
2 reproductive failure and is characterized by producing epididymitis, subfertility and infertility in rams
3 (*Ovis aries*) affecting the reproductive efficiency of herds, causing serious economic losses. The
4 objective of this study was to determine the blood distribution of CD4, CD8, and T $\gamma\delta$ LT lymphocytes
5 (WC1) in rams with chronic experimental infection with *Brucella ovis*. In the work, 18 rams from 1 to
6 4 years old and free from *B. ovis* were used; which were divided into three groups: Group 1 (n = 6):
7 control, Group 2 (n = 6), inoculation in mucosa with *B. ovis* and Group 3 (n = 6) intravenous
8 inoculation with *B. ovis*. Serological follow-up was carried out from the day of inoculation until 189
9 dPI (day post inoculation). CD4 and CD8 lymphocyte populations were immunotyped at 120, 150 and
10 189 and WC1 (T $\gamma\delta$ cell) at 120 dPI by flow cytometry. On the other hand, third IPD began to
11 seroconvert, at 21 and 28 days all the animals of the intravenous and mucosal groups respectively,
12 presented positive. In addition, on day 189 of the IPD, 50% of the animals in the challenged groups
13 presented as positive or suspect to the ELISA test. Differences were found in the MIF of the CD8
14 lymphocytes of the control group and the endovenous group (p <0.05) at 120 dPI, with averages of
15 1027.4 and 499.6 respectively. These differences were also observed between the rams of the control
16 group, the mucosal group and the endovenous group for the MIF of the CD4 lymphocytes (p <0.05) at
17 189 dPI. The T $\gamma\delta$ (WC1) lymphocyte populations at 120 dPI, showed differences in MIF between the
18 control group and the mucosal group and the intravenous group (p <0.05). *Brucella ovis*, can modulate
19 the immune response of the host, CD4 and CD8 lymphocytes are important for host defence against
20 infection caused by *B. ovis*, populations of both CD4 and CD8 can fluctuate throughout the infection
21 by *B. ovis*. The participation of $\gamma\delta$ T lymphocytes could be an important factor in the control of the
22 infection caused by *B. ovis*.

23

24 **Key words:** Ovine epididymitis; *Brucella ovis*; AGID; ELISA, flow cytometry

25

26

27

INTRODUCCIÓN

1 La epididimitis causada por *Brucella ovis* (*B. ovis*) es una enfermedad contagiosa de
2 transmisión venérea que causa falla reproductiva (Moustakas *et al.*, 2013; Costa *et al.*, 2016), y se
3 caracteriza por producir epididimitis, subfertilidad e infertilidad en carneros (*Ovis aries*) (Galindo *et*
4 *al.*, 2009b; Ridler *et al.*, 2014). En los carneros, las lesiones crónicas causadas por *B. ovis* se restringen
5 al aparato genital, específicamente al epidídimo y eventualmente testículos y glándulas asociadas al
6 aparato reproductor; por lo que, dichas lesiones provocan significativas pérdidas económicas a nivel
7 mundial (Xavier *et al.*, 2010).

8 El primer informe sobre *B. ovis* en México fue en 1974 cuando se encontró serología positiva
9 en 2.6% de un total de 380 sueros obtenidos de borregos Tabasco. No fue sino hasta 1979 en que se
10 logró aislar *B. ovis* de sementales Suffolk en el estado de Guanajuato. Los datos referentes a la
11 infección de ovinos por brucelosis en México son escasos. A pesar de que existen informes sobre la
12 erradicación de esta enfermedad en México en 1991, otros autores reportan prevalencias de la
13 enfermedad en diferentes Estados de México, como Jalisco, Estado de México, Tlaxcala, Hidalgo,
14 Guanajuato, Nuevo León, Puebla, Veracruz, Jalisco, México D.F., Estado de México e Hidalgo (Lopez Merino *et al* 1993; Núñez-Torres *et al.*, 1998).

15 El carácter intracelular facultativo de *Brucella* condiciona la respuesta inmune del hospedador.
16 Se trata de una respuesta inmunitaria mixta, de tipo humoral y celular, cuya intensidad y duración
17 pueden variar por diversos factores. La respuesta inmunitaria humoral a *B. ovis* ha sido estudiada a
18 través de las pruebas serológicas clásicas indicando que esta respuesta ha estado dirigida
19 principalmente contra el lipopolisacárido rugoso (LPS-R) y las proteínas de membrana externa (PME).
20 Las técnicas más eficientes para el serodiagnóstico de la infección por *B. ovis*, son la fijación del
21 complemento, inmunodifusión en gel de agar (IGDA) y ELISA directa e indirecta. Por otro lado
22 estudios experimentales demostraron que la inmunidad humoral cumple un rol más importante que la
23 celular en la protección, aunque se desconoce cuáles son las células implicadas en la respuesta. Por
24 otro lado, el predominio de los isotipos IgG2a e IgG3 en ratón permitiría inferir que *B. ovis* induce la
25 población de linfocitos T colaboradores del tipo 1 (LTh1) productores de interferón γ . (Galindo *et al.*,
26 2009a; Praud *et al.*, 2012)
27

1 Las células T CD4 se describen generalmente como células «auxiliares». Ellos tienen un papel
2 importante en el control y regulación del sistema inmune colaborando en la activación de las células B
3 y en la generación de células T CD8 citotóxicas (Allen e Maizels, 1997; Cummins *et al.*, 2010).
4 Según el perfil de secreción citoquinas, las células T CD4 son agrupadas en diferentes grupos que
5 colaboran a mantener la homeostasis en la respuesta inmune entre la respuesta proinflamatoria y la
6 antiinflamatoria. La heterogeneidad de las células T se describió por primera vez hace dos décadas con
7 la descripción de las células TH1 y TH2 (Issuree *et al.*, 2017; Cobbold *et al.*, 2018). Las células TH1
8 están involucradas en la defensa del huésped contra patógenos intracelulares y células tumorales
9 produciendo altos niveles de IFN- γ , TNF- α e IL-2. Las células TH2 son responsables de coordinar la
10 inmunidad humoral, inflamación eosinofílica y están involucrados en la defensa del huésped contra
11 parásitos extracelulares secretando IL-4, IL-5, IL-10 y IL-13. Nuevos subconjuntos distintos (TH9,
12 TH22, TH17, THFH, NKT, Treg células) se han descrito confirmando la heterogeneidad de la Familia
13 de células T CD4 (Márquez e Cheroutre, 2010; Hawkins *et al.*, 2013). Varios estudios en ratones y
14 humanos han reportado un potencial citotóxico de las células T CD4 (Van Der Veken *et al.*, 2005)

15 Aunque la inmunidad innata es capaz de controlar *Brucella*. La inmunidad específica es
16 necesaria para montar una respuesta inmune fuerte en etapas tardías de la infección (Baldwin e
17 Goenka, 2006). Se ha descrito ampliamente que la respuesta TH1 mediada por IFN- γ son esenciales
18 para el aclaramiento del patógeno. De hecho, IFN- γ producido por células T CD4 y las células T $\gamma\delta$
19 han demostrado recientemente activar las propiedades bactericidas en macrófagos para dificultar
20 supervivencia intra-huésped de la *Brucella*, mientras que IFN- γ producido por células T CD8 y la
21 inmunidad humoral relacionada con las células B son jugadores modestos contra la infección por
22 *Brucella* en ratones (Skyberg *et al.*, 2011; Vitry *et al.*, 2012). En otros estudios se demostró que los
23 isotipos de anticuerpos tipo TH1 tales como IgG2a IgG3, opsonizan la *Brucella* para facilitar la
24 fagocitosis y la liberación bacteriana en compartimentos endocíticos degradativos (Goenka *et al.*,
25 2011). En los seres humanos, las células T CD4 productoras de IFN- γ , las células T CD8 y las células
26 T $\gamma\delta$ han sido implicadas en el control de la brucelosis (Bessoles *et al.*, 2011; Cannella *et al.*, 2012).

27 Con respecto a la distribución de los linfocitos T $\gamma\delta$, se considera que su proporción con
28 respecto a otros linfocitos es reducida en los órganos linfoides, sin embargo aumentan su proporción

1 en la piel y superficies mucosas esta distribución sugiere un papel importante de estas células en la
2 vigilancia y repuesta inmediata a los patógenos invasores (Dudal *et al.*, 2006; Plattner e Hostetter,
3 2011; Acosta-Dibarrat *et al.*, 2014, Acosta Dibarrat *et al.* 2016). Los linfocitos T $\gamma\delta$ están bien
4 representada en las células sanguíneas mononucleares periféricas. Los linfocitos T $\gamma\delta$ representan l a
5 10% de los linfocitos T circulantes en humanos adultos y ratones. En bovinos adultos estas células
6 representan aproximadamente 10 a 25%, aunque este número puede ser tan alto como un 40% en
7 terneros jóvenes, en el caso de los ovinos es del 17% (Plattner and Hostetter, 2011; Ni *et al.*, 2012).
8 Por lo tanto el objetivo de este estudio fue caracterizar la distribución en sangre de linfocitos T CD4,
9 CD8, LT $\gamma\delta$ (WC1) en carneros con infección experimental crónica con *Brucella ovis* por vía mucosal
10 y endovenosa.

11 MATERIAL Y MÉTODOS

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

16 Animales

17 Se emplearon dieciocho carneros de las razas Columbia, Romanov y Pelibuey, con edad entre
18 1-4 años. Los carneros procedían de un establecimiento libre de *B. ovis*. Se constató que los animales
19 no presentaron signos de epididimitis mediante el examen clínico, también fueron sometidos a dos
20 pruebas serológicas de IGDA, ELISA y cultivo bacteriológico en semen y en lavado prepucial, las
21 cuales resultaron negativas. Los animales fueron alimentados *ad libitum* con heno avena (*Avena*
22 *sativa*) y alimento comercial (14% Proteína cruda).

23 Los carneros se distribuyeron aleatoriamente en tres grupos (n= 6) y sometidos a los siguientes
24 tratamientos: Grupo 1: control negativo al que se le administró instilación conjuntival y prepucial de
25 0,5 mL de solución salina al 0,9% (SS), Grupo 2: inoculación en mucosas: instilación de *B. ovis* en la
26 mucosa conjuntival y prepucial con 0,5 mL de inóculo con una concentración de $3,9 \times 10^9$ UFC en
27 ambas mucosas; Grupo 3: vía intravenosa con la aplicación de 1 mL del inóculo en la vena yugular a
28 la misma concentración. La instilación en conjuntiva se realizó en el ojo izquierdo de cada animal con

1 el volumen y concentración antes mencionados, mientras que la administración prepucial consistió en
2 la introducción del inoculo o la SS según el grupo usando una jeringa sin aguja y posterior masaje con
3 la abertura prepucial cerrada.

4 **Preparación del inóculo de desafío**

5 Se inocularon placas de agar sangre con la cepa de campo *B. ovis* 01Zac-INIFAP obtenida del
6 epididimo de un camero con epididimitis en el estado de Zacatecas, México, que se incubaron a 37°C
7 durante 48 horas (h), en una atmósfera con 10% de CO₂. Se cosecharon con SS. Al inóculo se le
8 realizó conteo de UFC [14] y se estandarizó a una concentración de $3,9 \times 10^8$ UFC/mL.

9 **Muestreo**

10 Se colectaron muestras de sueros y de semen de todos los cameros para realizar pruebas serológicas
11 de ELISA y detectar *B. ovis* por PCR, a lo largo de 6 meses en los días (d) 0; 3; 7; 13; 21; 28; 42; 56;
12 70; 80; 120; 150; 189. Las muestras de sangre (5 mL), se obtuvieron en tubos estériles (BD Franklin
13 Lake NJ, EUA), se separó el suero por centrifugación (Becton Dickinson Clay Adams, EUA) luego se
14 conservaron -80°C en ultra congelador (Thermo Fisher Scientific/ Revco, ULT1786-3-A40, EUA)
15 hasta utilización.

16 Se tomaron de 4-5 mL de muestras de sangre para realizar la fenotipificación de CD4 y CD8 a
17 los 120, 150 y 189 y de WC1 (linfocitos Ty6) a los 120 días post IE. Las muestras se transportaron al
18 laboratorio y se mantuvieron a 4°C hasta su procesamiento dentro de las 12 horas posteriores a la
19 extracción utilizando citometría de flujo.

20 **Prueba de ELISA**

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

26 **Inmunofenotipificación de poblaciones linfocitarias**

27 Se obtuvieron 500 µL de sangre periférica que se diluyeron en 500 µL de PBS-BSA (1:1). La
28 separación de los linfocitos se realiza empleando 3 mL de Lymphoprep (Stemcell, Canada) a 4°C. El

1 anillo obtenido se centrifugó a 80 g durante 20 minutos obteniendo el tapón linfocitario suspendiendo
2 estos en 2 mL de PBS-BCA para su lavado. Las células leucocitarias se suspenden en 1000 µL de
3 PBS-BSA a 4° C. Para su marcaje se toman 150 µL de la muestra y se adicionan 50 µL de los
4 anticuerpos monoclonales (CD4 Alexa Fluor, CD8 PE, WC1 FITC, Laboratorio Serotec) con
5 reactividad para ovino.

6

7 **Análisis estadístico**

8 La prueba t de series apareadas se empleó para el análisis de las Medias de Intensidad de
9 Fluorescencia (MIF) obtenidas por citometría de flujo. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron
10 significativos. Se empleó el Software InfoStat. <http://www.infostat.com.ar/w>

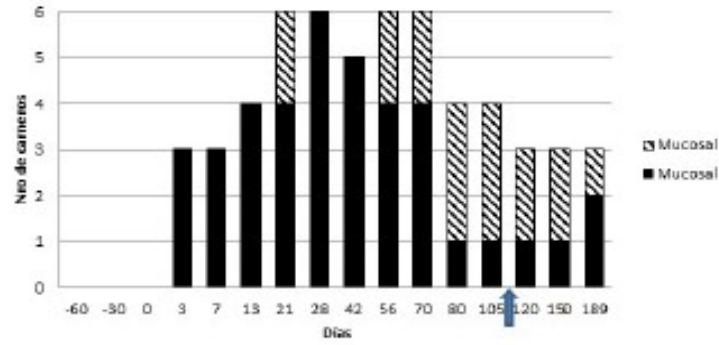
11

12

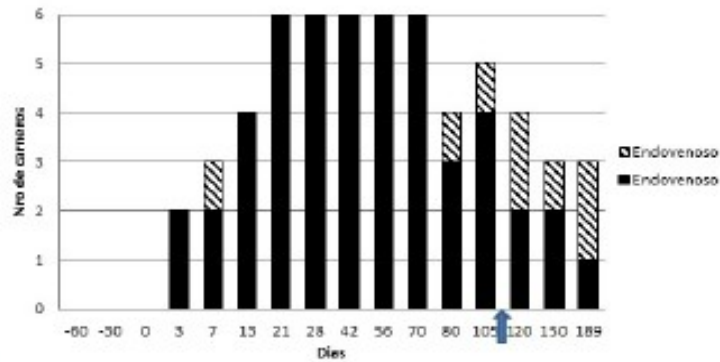
12 **RESULTADOS**

13 **Serología**

14 Las Figuras 1 y 2 muestran los resultados de las pruebas serológicas para los grupos con
15 inoculación experimental, los animales del grupo control resultaron negativos durante todo el
16 desarrollo del experimento. A partir del tercer dPI comenzaron a seroconvertir, a los 21 y 28 días
17 todos los animales de los grupos intravenoso y mucosal respectivamente se presentaron positivos. La
18 disminución de la seropositividad en el día 56 y 80 para la vía mucosal y endovenosa con un 66 y 50%
19 de seropositividad respectivamente. Al final del experimento al 189 dPI el 50% de los animales de los
20 grupos desafiados se presentaron como positivos o sospechosos a la prueba de ELISA



1
 2 **Figura 1.** Detección de anticuerpos por ELISA, en sueros de ovinos (grupo 2) infectados con
 3 *B. ovis* en mucosas durante una fase crónica.



6
 7 **Figura 2.** Detección de anticuerpos por ELISA, en sueros de ovinos (grupo 3) infectados con
 8 *B. ovis* por vía endovenosa durante una fase crónica. ↑ Indica el momento a partir del cual se
 9 realizaron las lecturas de poblaciones linfocitarias

10 El cuadro 1 muestra las diferencias entre la Medias de Intensidad de fluorescencia (MIF) de
 11 las poblaciones linfocitarias CD4 y CD8 de los grupos infectados con *B. ovis* en el 120,150 y189 días

1 en fase crónica. Se encontraron diferencias además en la comparación de MIF de los linfocitos CD8
 2 entre el grupo control y el grupo endovenoso ($p < 0,05$) a los 120 días post infección, con medias de
 3 1027,4 y 499,6 respectivamente. Estas diferencias se observaron también entre los careros del grupo
 4 control, el grupo mucosal y el grupo endovenosos para las MIF de los linfocitos CD4 ($p < 0,05$) a los
 5 189 días. En cuanto a los 150 días no se encontraron diferencias significativas para ($p < 0,05$) entre el
 6 control y los grupos de tratamiento mucosal y endovenosos para las poblaciones CD4 y CD8.

Cuadro 1. Comparación de MIF de las poblaciones linfocitarias CD4 y CD8 entre los grupos infectados en el 120,150 y 189 días de la fase crónica con *B. ovis*.

	Días post infección		
	Grupo Control	Grupo Mucosal	Grupo Endovenoso
	120 días		
CD4	509,4	567,6	604,7
CD8	1027,4 ^a	682,4	499,61 ^a
	150 días		
CD4	924,1	683,8	822,1
CD8	704,1	1063,7	724,2
	189 días		
CD4	604,1 ^a	634,3 ^b	483,9 ^{ab}
CD8	747,6	848,1	800,2

7 ^{ab} diferencias ($p < 0,05$) entre tiempos de infección dentro de grupos.

8
 9 En el cuadro 2 se muestran las diferencias entre las MIF de las poblaciones CD4 en los 120,
 10 150 y 189 dPI para el grupo control, mucosal y endovenoso ($p < 0,05$). En el caso de los linfocitos
 11 CD8 se observó diferencias en los grupo control, mucosal y endovenoso en los días 120 y 189dPI
 12 para ($p < 0,05$). Sin embargo a los 150 dPI solo observó diferencias significativas entre el grupo control
 13 y el endovenoso.

14 Cuadro 2. Comparación de MIF de las poblaciones linfocitarias CD4 y CD8 entre los tiempos de infección crónica con *B. ovis*.

	Grupo	Tiempo de Infección		
		120	150	189
CD4	Control	236,5 ^a	924,1 ^a	604,1 ^a
	Mucosal	256 ^a	703,4 ^a	634,4 ^a
	Endovenoso	239,7 ^a	822,1 ^{ab}	483,9 ^{ab}

	Control	345,8 ^a	704,1	747,8 ^a
CDS	Mucosal	268,8 ^a	1063,3 ^a	838,2 ^a
	Endovenoso	204 ^a	724,2 ^a	800,2 ^a

^a diferencias (p<0,05) entre tiempos de infección.

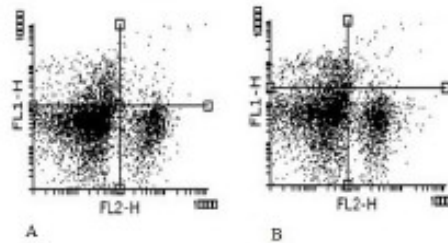
Las poblaciones linfocitarias T γδ también fueron marcadas con WC1 a los 120 dPI y se encontró diferencia en MIF entre el grupo control, el grupo mucosal y el endovenoso (p<0,05). Por otro lado no se observó diferencia entre las MIF de los grupos de cameros infectados por vía mucosal como por vía endovenoso con *B. ovis* (p>0,05). (Cuadro 3).

Cuadro 3. Comparación de MIF de las poblaciones linfocitarias T γδ WC1 a los 120 días de infección crónica con *B. ovis*.

	Control	Grupo Mucosal	Endovenoso
	1642,5 ^a	1251,8 ^a	1103 ^a

^a diferencia (p<0,05) entre grupos los 120 días de infección.

En la Figura 3 se muestra la inmunofenotipificación de linfocitos T γδ en cameros infectados con *B. ovis* por vía endovenosa(A) y mucosal (B) a los 120 días donde se observa la positividad de los CD8 en el cuadrante inferior derecho y la positividad de los linfocitos T γδ en el cuadrante izquierdo superior, se destaca una similitud en el número de linfocitos T γδ para ambas vías de infección, es por ello que no hubo diferencias significativas para p<0,05 entre las MIF de estas poblaciones entre la vía mucosal y endovenosa a los 120dPI.



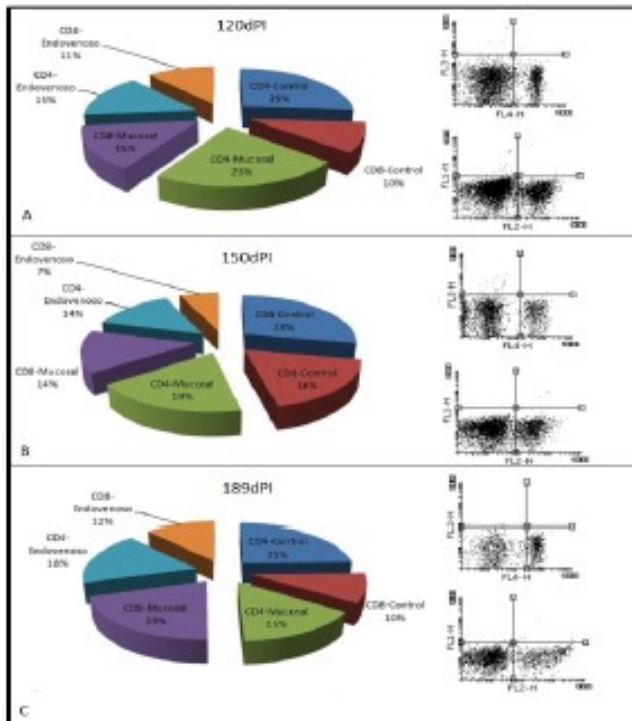
1

2 Figura 3. Inmunofenotipificación de linfocitos T γδ (WC1) en carneros infectados con *B. ovis*
3 por vía endovenosa(A) y mucosal (B) a los 120 días. (FL2: CD8Pe; FL1: WC1 FITC)

4

5 En nuestro estudio también se analizó el porcentaje de poblaciones linfocitarias que
6 mostraron positividad a los marcadores CD4-Alexa fluor, CD8-Pe a los 120,150, y 189 dPI
7 con *B. ovis*. En la Figura 4 cuadrante A se observa que el 23% de la población linfocitaria a los
8 120dPI con *B. ovis* por vía mucosal corresponde a linfocitos CD4, mientras que el 15%
9 corresponde a linfocitos CD8, por su parte por la vía endovenosa un 15% corresponde a
10 linfocitos CD4 y el 11% a linfocitos CD8, en la parte derecha de cuadrante A se observan los
11 dotplot representativos de estas dos poblaciones, estos gráficos corresponden a los carneros
12 58-CD4 y 38-CD8. En el cuadrante B también predomina los linfocitos CD4 del grupo
13 mucosal a los 150dPI con un 19% y los linfocitos CD8 representan un 14%, sin embargo la
14 población linfocitaria de CD4 por vía endovenosa representa un 14% y un 7% de linfocitos
15 CD8. Por su parte, en el cuadrante C la población de linfocitos CD4 y CD8 de carneros
16 infectados por vía mucosal representan el 15% y el 20% respectivamente y las poblaciones
17 CD4 y CD8 de los carneros infectados con *B. ovis* por endovenosas representan 18 y 12 % a
18 los 189 días. Se observa que a medida que transcurre el tiempo las poblaciones de linfocitos
19 CD4 de los carneros infectados por vía mucosal con *B. ovis* disminuyen. Sin embargo en la
20 población de CD8 del grupo mucosal hay un aumento de un 15 a un 20% del día 120 al 189
21 dPI. Por su parte el comportamiento de los linfocitos CD4 y CD8 de la vía endovenosa
22 difieren, el CD4 aumenta de 15 a 18% y el CD8 varía de 11 a 7% y luego sube a 12% a los
23 189dPI.

24



1
 2 Figura 4.- Inmunofenotipificación de linfocitos CD4 y CD8 en carneros infectados con *B. ovis* por vía
 3 mucosal y endovenosa a los 120,150 y 189 días. (FL2: CD8Pe; FL4:CD4 Aleza-Fluor)

4
 5
 6
 7
 8
 9 **DISCUSIÓN**

10
 11 La *Brucella ovis* causa una infección de carácter reproductivo que afecta la fertilidad de los
 12 cameros con el consecuente detrimento económico en los sistemas de producción ovina. *Brucella* es

1 una bacteria que puede sobrevivir dentro de las células del hospedero, causando enfermedades
2 crónicas, en humanos se ha observado que es capaz de modular negativamente la expresión de la
3 porción Fc de IgG, restringiendo con ello la fagocitosis regulada por el IFN- γ en macrófagos, esta
4 acción es independiente de la viabilidad bacteriana, ya que ocurre lo mismo con bacterias muertas, el
5 resultado de ello es que la presencia de la bacteria modifica la respuesta inmune (Barrionuevo *et al.*,
6 2011)

7 La protección contra la brucelosis, depende principalmente de la inmunidad mediada por
8 células que involucra macrófagos, células dendríticas y linfocitos T, tanto CD4 como CD8, los que son
9 relevantes en la respuesta inmune durante la infección. El IFN- γ que es secretado por CD4 regula la
10 actividad de los macrófagos, mientras que por su parte los linfocitos CD8, causarían lisis en las células
11 infectadas por las *Brucella* (Koch *et al.*, 2012). Por tanto ambas poblaciones de linfocitos son
12 importantes para el control de la brucelosis, en el caso de la infección causada por *B. ovis* en cameros,
13 no es clara la participación de CD4 y CD8 durante las infecciones crónicas, por ello es que el objetivo
14 de este trabajo fue la determinación de linfocitos CD4 y CD8 durante un proceso crónico en cameros.

15 En este trabajo se encontraron diferencias en las MIF de las poblaciones linfocitarias CD8 del
16 grupo control comparado con el grupo endovenoso, a los 120 dPI, y en las poblaciones de CD4 del
17 grupo control con el mucosal y endovenoso a los 189 dPI, ello muestra que la participación de CD4
18 y CD8 en los procesos crónicos de *B. ovis* puede ser determinante para el control de la infección
19 (Díaz *et al.*, 2013; Costa *et al.*, 2016). Por otro lado se encontró diferencia sólo en las poblaciones de
20 CD4 y no de CD8 del grupo mucosal y el grupo endovenoso a los 189dPI, lo que podría deberse a la
21 fluctuación que concurre durante los procesos crónicos causados por Brucelosis. En trabajos
22 realizados en el 2013 por Silva, se evaluó la positividad a *B. ovis* usando inmunodifusión en gel de
23 agar (IGDA), donde a los 30 días todos los animales fueron positivos similar, ocurrió en nuestro
24 trabajo donde la positividad fue evaluada mediante ELISA observándose que en la infección con *B*
25 *ovis* por vía mucosal y endovenosa en el día 28 donde se observa positividad del 100% en todos los
26 animales tratados, En trabajos de Silva a los 168 días post-infección el 50% de los cameros se
27 mantuvieron positivos, en nuestro trabajo en el día 189 el 50% de los cameros de ambos grupos
28 presentaban grados de seroconversión positiva a la infección de *B. ovis*. En adición se observa en el

1 trabajo de Silva un aumento de la proliferación de linfocitos, mostrando un aumento significativo de
2 los linfocitos CD4 en la primera semana de infección, sin embargo a las 4 y 11 semanas las
3 poblaciones de linfocitos CD4 de los grupos con *B. ovis* no difieren significativamente del grupo
4 control. En nuestro trabajo en la vía mucosal hay una disminución de linfocitos CD4 del 23% al 15%
5 en los días 120 al 189 post-infección. En este mismo periodo los linfocitos CD8 fueron en aumento
6 coincidiendo con el trabajo de Silva el cual reporta un aumento de estos linfocitos a la 4ta y onceava
7 semana (Silva *et al.*, 2013).

8 La respuesta inmune mantiene un equilibrio para la defensa contra patógenos intracelulares
9 como es el caso de *B. ovis*, se ha reportado que en el caso de la infección por *Brucella abortus*
10 generalmente CD4 auxilia en el control y regulación del sistema inmune con participación activa pro y
11 antiinflamatoria, dependiendo de los perfiles de secreción de citoquinas (Martirosyan *et al.*, 2013;
12 Issuree *et al.*, 2017) es posible que la fluctuación observada en este trabajo sea causada por los
13 diferentes perfiles de citoquinas presentes en el tiempo que dura la infección. En tanto que la
14 participación de CD8, al ser citotóxica, tenga menor variación. Por otro lado, en este trabajo se
15 observaron diferencias en las MIF a los 120dPI en linfocitos T $\gamma\delta$, por consiguiente se demuestra la
16 participación de éstos en esta infección tal como se ha reportado en humanos. Estas poblaciones son
17 importantes para el control de la infección con *B. ovis* en cameros donde el porcentaje de los linfocitos
18 $\gamma\delta$ es mayor al 15% (Skyberg *et al.*, 2011). Es por ello que promover la realización de más trabajos
19 encaminados a dilucidar la participación de linfocitos CD4 y CD8 en la *Brucellosis ovina* permitirá
20 conocer su función en equilibrio del sistema inmune de animales infectados en fase crónica

21

22 CONCLUSIONES

23 *Brucella ovis*, puede modular la respuesta inmune del hospedero, linfocitos CD4 y
24 CD8 son importantes para la defensa del hospedero ante la infección causada por *B. ovis*, las
25 poblaciones tanto de CD4 como CD8 pueden fluctuar a lo largo de la infección por *B. ovis*, la
26 participación de los linfocitos T $\gamma\delta$ podría ser un factor importante en el control de la
27 infección causada por *B. ovis*.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación fue financiado por el proyecto PROMEP/103.5/10/4368 y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), bajo el Programa de Consolidación Institucional de Grupos de Investigación. Retención Ref: 09-01.117071. Al Dr. Efrén Díaz Aparicio del CENID Microbiología México, por el suministro del asilamiento de *B. ovis*.

LITERATURA CITADA

Acosta-Dibarrat J, Buendia-Jimenez A, Soriano-Vargas E, Montes De Oca-Jiménez R, Tórtora-Perez J. 2014. Distribution of immune response cells in the pelvic urethra and the prepuce of rams. *Pesqui. Vet. Bras.* 34:270-276. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2014000300012>

Acosta-Dibarrat J, Tórtora-Pérez J, Tenorio-Gutiérrez V, Soriano-Vargas E, Talavera Rojas M, Cal-Pereyra L, Montes De Oca Jiménez R, Velázquez Ordoñez V. 2016. Distribution of lymphocytes, immunoglobulin-containing cells, macrophages, and dendritic cells in the accessory sex glands of rams experimentally infected with *Actinobacillus seminis*. 2016. *Pesqui Vet Bras* 36:363-372. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2016000500363

Allen JE, Maizels RM. 1997. Th1-Th2: reliable paradigm or dangerous dogma? *Immunol Today* 18: 387-392. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9267081> .

1 Baldwin CL, Goenka R. (2006) Host immune responses to the intracellular bacteria *Brucella*:
2 does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection? *Crit Rev Immunol* 26:407-
3 442. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17341186> .
4
5 Barrionuevo P, et al. 2011. *Brucella abortus* inhibits IFN- γ -induced Fc γ RI expression and
6 Fc γ RI-restricted phagocytosis via toll-like receptor 2 on human monocytes/macrophages.
7 *Microbes Infect* 13:239-250. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21070860> .
8
9 Bessoles S, et al. 2011. Role of NKG2D and its ligands in the anti-infectious activity of
10 V γ 9V δ 2 T cells against intracellular bacteria. *Eur J Immunol* 41:1619-1628.
11 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21469127> .
12
13 Cannella AP, et al. 2012. Antigen-specific acquired immunity in human brucellosis:
14 implications for diagnosis, prognosis, and vaccine development. *Front Cell Infect Microbiol*
15 2: 1. . <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22919593> .
16
17 Cobbold SP, et al. 2018. CD4. *Front Immunol* 9:1381.
18 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29967616> .
19
20 Costa LF, et al. 2016. Serologic and molecular evidence of *Brucella ovis* infection in ovine
21 and caprine flocks in the State of Minas Gerais, Brazil. *BMC Res Notes* 9: 190.
22 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27017445> .
23
24 Cunnusamy K, Chen PW, Niederkorn JY. 2010. Paradigm shifts in the role of CD4+ T cells
25 in keratoplasty. *Discov Med* 10:452-461. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21122477> .

1
2 Dudal S, et al. 2016. Release of LL-37 by activated human Vgamma9Vdelta2 T cells: a
3 microbicidal weapon against *Brucella suis*. *J Immunol* 177:5533-5539.
4 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27015740> .
5
6 Díaz AG, et al. 2013. Immune response and serum bactericidal activity against *Brucella ovis*
7 elicited using a short immunization schedule with the polymeric antigen BLSOmp31 in rams.
8 *Vet Immunol Immunopathol* 154:36-41. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23643287>
9
10 Galindo RC, et al. 2009a. Characterization of possible correlates of protective response
11 against *Brucella ovis* infection in rams immunized with the *B. melitensis* Rev 1 vaccine.
12 *Vaccine* 27:3039-3044. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19428917> >.
13
14 Galindo RC, et al. 2009b. Differential expression of inflammatory and immune response
15 genes in rams experimentally infected with a rough virulent strain of *Brucella ovis*. *Vet*
16 *Immunol Immunopathol* 127:295-303. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19056128>.
17
18 Goenka R, et al. 2011. B cell-deficient mice display markedly enhanced resistance to the
19 intracellular bacterium *Brucella abortus*. *J Infect Dis* 203:1136-1146.
20 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21451002>.
21
22 Hanot Mambres D, et al. 2016. Identification of Immune Effectors Essential to the Control of
23 Primary and Secondary Intranasal Infection with *Brucella melitensis* in Mice. *J Immunol* 196:
24 3780-3793. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27036913> .
25

1 Hawkins RD, et al. 2013. Global chromatin state analysis reveals lineage-specific enhancers
2 during the initiation of human T helper 1 and T helper 2 cell polarization. *Immunity* 38:1271-
3 1284. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23791644>.
4
5 Issuree PD, Ng CP, Littman DR. 2017. Heritable Gene Regulation in the CD4:CD8 T Cell
6 Lineage Choice. *Front Immunol* 8: 291. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28382035>.
7
8 Koch, MA. et al. 2012. T-bet(+) Treg cells undergo abortive Th1 cell differentiation due to
9 impaired expression of IL-12 receptor β 2. *Immunity* 37: 501-510.
10 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22960221>.
11
12 Martirosyan A, et al. 2013. In vivo identification and characterization of CD4⁺ cytotoxic T
13 cells induced by virulent *Brucella abortus* infection. *PLoS One* 8: e82508.
14 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24367519>.
15
16 Moustacas VS, et al. 2013. Species-specific multiplex PCR for the diagnosis of *Brucella ovis*,
17 *Actinobacillus seminis*, and *Histophilus somni* infection in rams. *BMC Vet Res* 9:51.
18 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23514236>.
19
20 Mucida D, Cheroutre H. 2010. The many face-lifts of CD4 T helper cells. *Adv Immunol* 107:
21 139-152. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21034973>.
22
23 Ni M, et al. 2012. Full restoration of Brucella-infected dendritic cell functionality through
24 V γ 9V δ 2 T helper type 1 crosstalk. *PLoS One* 7: e43613.
25 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22928003>.

1

2 Núñez-Torres E, et al. 1998. Stability of antigen and agarose used in a double
3 immunodiffusion serologic test for *Brucella ovis*. *J Vet Diagn Invest* 10:113-115.
4 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9580326>.

5

6 Plattner BL, Hostetter JM. 2011. Comparative gamma delta T cell immunology: a focus on
7 mycobacterial disease in cattle. *Vet Med Int* 2011: 214384,
8 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21647391>.

9

10 Praud A, et al. 2012. Assessment of the diagnostic sensitivity and specificity of an indirect
11 ELISA kit for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *BMC Vet Res* 8:68.
12 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22640401>.

13

14 Ridler AL, Smith SL, West DM. 2014. Seroconversion and semen shedding in rams
15 experimentally infected with *Brucella ovis*. *N Z Vet J* 62:47-50.
16 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24138019>.

17

18 Silva AP, et al. 2013. *Brucella ovis* lacking a species-specific putative ATP-binding cassette
19 transporter is attenuated but immunogenic in rams. *Vet Microbiol* 167:546-553.
20 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24075357>.

21

22 Skyberg JA, et al. 2011. Murine and bovine $\gamma\delta$ T cells enhance innate immunity against
23 *Brucella abortus* infections. *PLoS One* 6: e21978.
24 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21765931> >.

25

- 1 Van Der Leken, LT, et al. 2005. HLA class II restricted T-cell receptor gene transfer
2 generates CD4+ T cells with helper activity as well as cytotoxic capacity. *Gene Ther* 12:1686-
3 1695. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16034453> >.
- 4
- 5 Vitry MA, et al. 2012. Crucial role of gamma interferon-producing CD4+ Th1 cells but
6 dispensable function of CD8+ T cell, B cell, Th2, and Th17 responses in the control of
7 *Brucella melitensis* infection in mice. *Infect Immun* 80:4271-4280.
8 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23006848> >.
- 9
- 10 Xavier MN, et al. 2010. Development and evaluation of a species-specific PCR assay for the
11 detection of *Brucella ovis* infection in rams. *Vet Microbiol* 145:158-164.
12 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20347534> >.
- 13
- 14

DISCUSIÓN

En la industria pecuaria, las infecciones bacterianas y virales del tracto reproductivo en machos de diferentes especies, son causa de infertilidad, durante los últimos años, dichas enfermedades emergen como un tópico de investigación por las grandes pérdidas económicas que provocan, aunado a ello, estos tópicos se relacionan con la respuesta inmune (Anastasiadou, et al., 2013).

En este sentido, y como se mencionó anteriormente, las infecciones crónicas de *B. ovis* tienden a cobrar relevancia por las grandes pérdidas económicas que provocan. La epididimitis en ovinos esta predominantemente asociada a la infección causada por *B. ovis* (Carvalho, et al., 2012).

B. ovis es una bacteria, capaz de diseminarse a los órganos del hospedero y puede desarrollarse y multiplicarse al interior de células del sistema inmune, sin embargo, su silente presencia conlleva a una enfermedad crónica que causa severas complicaciones (Vitry, et al., 2012). Las bacterias tales como la *B. ovis*, que causan enfermedades crónicas, no sólo son capaces de evadir la respuesta inmune, sino que esa capacidad les permite sobrevivir en el hospedero durante mucho tiempo (Barrionuevo, et al., 2011).

B. ovis, presenta una serie mecanismos de patogenicidad para modular de manera precisa el sistema inmune, primero para evadir la respuesta innata, previniendo así el que se monte adecuadamente la respuesta inmune adquirida y finalmente estableciéndose crónicamente dentro del hospedero (Barrionuevo, et al., 2011). Con respecto a esto se ha reportado que el sistema de secreción tipo IV VirB se involucra en el control de la maduración al interior de la vacuola que contiene a la Brucella, permitiendo con ello la replicación de la misma (Barrionuevo, et al., 2011). Además, los glucanos cíclicos b1-2, ayudan a prevenir la fusión fago soma-lisosoma permitiendo con ello la replicación intracelular (Arellano-Reynoso, et al., 2005). Por otro lado, el polisacárido inhibe la fagocitosis, protegiendo así a la *Brucella ovis* del fago lisosoma e inhibiendo la apoptosis celular (Barrionuevo, et al., 2011).

La enfermedad causada por *Brucella ovis*, aparentemente ocurre como una infección enzoótica dentro de una granja que ha tenido contacto con algún animal infectado; por otro lado, se ha reportado que la Brucella puede infectar comúnmente en grandes granjas en donde existen muchos carneros lotificados continuamente, a diferencia de granjas pequeñas donde a menudo se reemplazan los carneros (Bagley, et al., 1985).

En estudios previos, se ha reportado la dificultad de realizar una infección experimental con *Brucella ovis*, sobre todo por la dificultad de cultivar en semen a la bacteria (Brown, *et al.*, 1973), ahora se sabe que no todos los carneros infectados liberan la bacteria durante el proceso infeccioso (Silva, *et al.*, 2015; Picard-Hagen, *et al.*, 2015), en este trabajo fue posible el desarrollo de la infección con las vías de administración usadas.

En este estudio como ya se mencionó, las vías usadas durante la inoculación de la *Brucella*, fueron las adecuadas para inducir un proceso de infección, a diferencia de lo reportado por otros autores (Ridler, *et al.*, 2013) los cuales inoculan a través de vía rectal y conjuntival con semen infectado, en este trabajo al usar instilación palpebral con *Brucella ovis*, se ratifica esta vía como la principal vía natural de la infección por *Brucella ovis* (Blasco, *et al.*, 1987; Nakada, *et al.*, 2011), sin embargo, a diferencia de estos últimos, la concentración del inóculo usado fue diferente.

Las lesiones del epidídimo detectadas por palpación del escroto muestran un poca correlación con las características seminales, lo que sugiere que la palpación no es completamente confiable para detectar daños espermáticos causados por la infección de *Brucella ovis* (Ridler y West, 2002). Se ha reportado que la infección de *Brucella ovis*, causa efectos que deterioran la calidad del semen, lo que incluye material purulento, pérdida de motilidad en hasta un 20% y el incremento de anomalías morfológicas en casos crónicos (Ridler y West, 2002).

Las lesiones encontradas a partir de las 6 semanas pos infección incluyen: adherencias testiculares, deformaciones e incrementos en el tono del epidídimo, múltiples masas caseosas y quistes de contenido purulento, observables al corte del epidídimo; lesiones tales como epididimitis, vesiculitis seminal o ampulitis crónica se observaron histológicamente (Paolicchi, *et al.*, 2000). Las infecciones del tracto reproductivo a menudo son asociadas con la estimulación de inmunidad celular (Paolicchi, *et al.*, 2000; Silva, *et al.*, 2013).

En este estudio, los grupos de carneros desafiados con el inóculo de *B. ovis*, en ambos casos tanto el grupo mucosal como el grupo endovenoso se encontraron carneros que desarrollaron lesiones similares a las que previamente se han reportado como características de la infección, de manera que las vías de desafío y la concentración del inóculo fueron suficientes para el desarrollo de las lesiones en mención. Por tanto tal como se reportó previamente por (Birbestein, *et al.*, 1964; Carvalho, *et al.*, 2012; Azevedo de Paula Antunes, *et al.*, 2013), tanto la vía conjuntival como la mucosal sirven como vías de infección experimental, posiblemente porque también son las vías a través de las cuales naturalmente son infectados los carneros susceptibles que entran en contacto con los carneros infectados.

Así mismo la concentración que se utilizó para el desafío en los carneros ($3,9 \times 10^9$ UFC/ml) fue suficiente para causar la infección en los carneros del grupo mucosal; por otro lado la vía endovenosa también ha sido utilizada en carneros (Brown *et al.*, 1973) a diferencia de ellos, en este trabajo se utilizó como una vía de desafío y en el caso de Brown *et al.*; (1973), donde se utilizó como vía de refuerzo en el proceso de infección. Por lo tanto durante el estudio se comprobó que las vías y concentración que se utilizaron fueron adecuadas para causar las lesiones que concuerdan con los procesos causados por *B. ovis* (Birbestein, *et al.*, 1964; Nakada, *et al.*, 201; Carvalho, *et al.*, 2012).

Por otro lado en el caso de los carneros de los grupos desafiados, no todos desarrollaron cambios clínicos, a pesar de que estuvieron en contacto con *B. ovis*. Esto concuerda con los reportes de trabajos en los que algunos carneros no presentan cambios clínicos aún con resultados serológicos positivos (Carvalho, *et al.*, 2012; Troncoso, *et al.*, 2014).

En el caso de los carneros que desarrollaron cambios clínicos, éstos se presentaron aproximadamente a los 30 DPI y disminuyen para presentarse de nueva cuenta a partir de los 60 DPI y continúan de manera crónica (Carvalho, *et al.*, 2012), pero en este trabajo específicamente un carnero (ID 49), presentó las manifestaciones clínicas y éstas continuaron durante la duración del trabajo experimental. Estos datos concuerdan con reportes previos, donde se menciona que las lesiones encontradas a partir de las 6 semanas pos infección incluyen: adherencias testiculares, deformaciones e incrementos en el tono del epidídimo, múltiples masas caseosas y quistes de contenido purulento, observables al corte del epidídimo; lesiones tales como epididimitis, seminovesiculitis o ampulitis crónica se observaron histológicamente (Paolicchi, *et al.*, 2000).

Así mismo es posible encontrar carneros con o sin lesiones y títulos serológicos positivos, y que no liberan *B. ovis* en el semen (Burgess, 1982; Costa, *et al.*, 2012; Ridler, *et al.*, 2014); lo que representa un factor de riesgo en los sistemas de producción ovina en los que no se lleva a cabo de manera rutinaria el diagnóstico de ningún tipo, y en consecuencia permite la propagación de la enfermedad, más aún en las zonas en donde como sucede en México es común el intercambio de sementales sin llevar a cabo ningún control preventivo, así que cuando los productores comienzan a lidiar con problemas de fertilidad en los sementales, ya es difícil controlar la enfermedad (Ridler y West, 2002); sobre todo si se toma en cuenta que la liberación de la bacteria puede ser intermitente hasta por dos años (Costa, *et al.*, 2013; Paolicchi, *et al.*, 2013; Ridler, *et al.*, 2013).

En este trabajo se pudo corroborar que las pruebas de IGDA y ELISA son adecuadas para el diagnóstico de carneros infectados, incluso en el caso de ELISA las detecciones de animales sospechosos, en muestreos posteriores los carneros se muestran claramente positivos. El diagnóstico serológico por FC, puede realizarse dentro de las primeras 6-9 semanas, y permanecen así hasta por 7 meses, sin embargo la prueba presenta como desventaja una gran cantidad de falsos positivos o falsos negativos (Ley, 1993). En este estudio se observó que ELISA es una prueba con mayor sensibilidad y en el caso de falsos positivos no presentaría mayor problema ya que podrían ser detectadas en muestreos posteriores.

En algunas granjas las infecciones por *B. ovis*, pasan desapercibidas y sólo son detectadas cuando por alguna razón se realiza un examen apropiado de semen o bien se hacen pruebas serológicas, en este estudio al igual que otros reportes se encontraron animales positivos serológicamente y negativos al examen clínico y al tratar de aislar a la *Brucella ovis*, sin embargo los carneros pueden resultar positivos tal como fue el caso con ELISA en este estudio. (Xavier, *et al.*, 2010; Nakada, *et al.*, 2011; Costa, *et al.*, 2013; Picard-Hagen, *et al.*, 2015).

Se comprobó que las pruebas de serología utilizadas durante el mismo, resultaron ser adecuadas para el diagnóstico de los carneros afectados, a este respecto las dos pruebas son aceptadas tanto a nivel nacional en la (NOM-041-ZOO-1999) como a nivel internacional (OIE, 2009); además se han reportado como pruebas con resultados aceptables y de mayor uso para el diagnóstico de la infección causada por *B. ovis* (Nakada, *et al.*, 2011; Costa, *et al.*, 2012; Paolicci, *et al.*, 2013; Ridler, *et al.*, 2013; Troncoso, *et al.*, 2014; Picard-Hagen, *et al.*, 2015).

En este trabajo la prueba de ELISA mostró ser mejor para la detección incipiente del proceso infeccioso causado por *B. ovis*, ya que se pudieron detectar títulos al inicio de la infección experimental; diferente de lo que ocurrió con la prueba IGDA en las que no se detectaron seropositivos sino hasta ya avanzada la infección.

Dado que estas pruebas son incluidas para el control de la enfermedad, la prueba de ELISA posibilita tener mayor seguridad de detectar carneros infectados, sin embargo esta prueba deberá realizarse en conjunto con otras acciones tendientes a asegurar ese control (Ridler y West, 2002), incluyendo la evaluación clínica (Gouletsou y Fthenakis, 2010; Carvalho, *et al.*,

2012) con la finalidad de eficientar las herramientas diagnosticas que impacten positivamente en el control de la infección.

En el 83,3% de los carneros IE (vía mucosa 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. No se observaron cambios macroscópicos en las glándulas anexas.

En este estudio, el desarrollo de la infección en los carneros desafiados con el inóculo, se produjo como lo han descrito otros autores (Paolicchi, *et al.*, 2000; Ridler y West, 2002), además la distribución de la *B. ovis*, concuerda con lo reportado en otros trabajos todo ello en carneros sexualmente maduros (Beeman, *et al.*, 1982; Paolicchi, *et al.*, 2000), y al igual que en esos casos, en este estudio los carneros fueron todos mayores a un año de edad.

En cuanto a la excreción de la bacteria en semen, existen reportes que mencionan que es posible la liberación de la bacteria hasta por dos años pero de manera intermitente (Birbestein, *et al.*, 1964; Beeman, *et al.*, 1982, Xavier, *et al.*, 2010), sin embargo, en este estudio no se logró identificar en la mayoría de los casos durante los 189 días pos infección, y ello pudo deberse o bien a que la bacteria no se localizó en los órganos del aparato reproductivo lo que se describe como una infección transitoria-abortiva (Ridler, *et al.*, 2013) o bien el estudio termino antes de que llegará a dichos órganos.

La activación de genes pro inflamatorios podrían constituir un mecanismo general antibacteriano en los hospederos, en respuesta a bacterias intracelulares, por ejemplo se sabe que en ratones a las primeras horas post infección se activan las citoquinas pro infamatorias y se inactivan las citoquinas involucradas en el ciclo celular que participa en la apoptosis y en el trafico vesicular celular (Eskra, *et al.*, 2003).

Algunos estudios sugieren por ejemplo que durante la brucelosis en humanos, la producción de citoquinas Th1 es dominante al inicio de la enfermedad, cambiando por una respuesta Th 2 consecuencia del progreso de la enfermedad, así mismo se ha reportado que la resistencia a la *Brucella* depende de la respuesta Th 1, mientras que la respuesta Th 2 está asociada con la severidad de la enfermedad (Galindo, *et al.*, 2009).

Las pruebas de PCR en los carneros del estudio sólo mostraron resultados positivos en dos carneros, lo que previamente se reportó en condiciones similares para PCR en semen al igual

que en otros estudios con animales seropositivos a otras enfermedades (Ferre, *et al.*, 2005) incluyendo brucelosis por otras especies (Amin, *et al.*, 2001) y *B. ovis* (Costa, *et al.*, 2013; Silva, *et al.*, 2013). La ausencia de lesiones y escasez de células inflamatorias en el semen al igual que en otras infecciones del tracto reproductivo, son indicativo de una presentación subclínica de la infección (de la Puente-Redondo, *et al.*, 2000), de que la bacteria aún no se ha establecido por completo en el aparato reproductivo o bien que en el proceso la infección fue de tipo abortivo (Ridler, *et al.*, 2013; Picard-Hagen, *et al.*, 2015).

En este estudio, al menos un carnero infectado experimentalmente vía mucosal desarrolló lesiones y fue positivo a pruebas serológicas, sin embargo, en este carnero no fue posible aislar *B. ovis* en el laboratorio de bacteriología ni identificar a la bacteria por PCR tal como lo reportan otros autores (Xavier, *et al.*, 2010; Nakada, *et al.*, 2011).

Estes y Brown, (2002), establecieron que la respuesta inmune en cada individuo es diferente y depende de la relación existente entre las interleucinas de las respuestas Th1 y Th2 y de la cantidad y calidad de antígeno que se involucre en el proceso de defensa de cada organismo. Puesto que, la acción de la respuesta inmune está dirigida a la eliminación de *Brucella* e involucra acciones tanto de Th1 como de Th2 (Leal-Hernández *et al.*; 2009), y en estudios previos se ha mostrado la activación de las respuestas adaptativa e innata (da Costa, *et al.*, 2012; Azevedo de Paula Antunes, *et al.*, 2013). Además, la proporción de isotipos en la respuesta inmune está regulada por un balance delicado de las interleucinas Th1/Th2, así como la cantidad y calidad del antígeno que participa en el proceso (Estes y Brown, 2002) aunque Th1 es mejor contra bacterias intracelulares (Estein, 1999). Sin embargo, el perfil inmune que se refleja es el resultado de ambas respuestas Th1 y Th2 (Galindo, *et al.*, 2009).

Existen bacterias que tienen la capacidad de modular la respuesta inmune, evadiendo los efectos bactericidas del hospedero (Finlay y McFadden, 2006). *B. ovis* podría presentar diversos mecanismos que para inhibir o evadir la respuesta inmune que induce al IFN- γ ; tal como ocurre en el caso de *Brucella abortus*, para inhibir la expresión inducida por IFN- γ de moléculas de MHC II y la presentación de antígenos en macrófagos, los componentes responsables de esa actividad son las lipoproteínas (Barrionuevo, *et al.*, 2011), lo cual podría ser similar a lo que produce la infección de *Brucella ovis* como en el caso de este estudio donde se encuentran valores máximos de MHCII una vez que transcurrió el suficiente tiempo para montar una respuesta inmune.

En el caso de los carneros, se debe recordar la presencia de un gran número de células T $\gamma\delta$, que pueden fluctuar rápidamente en la sangre y producir INF γ , lo cual, sugiere que la

respuesta para esta fluctuación podría estar relacionada con el establecimiento en los animales de una respuesta inmune tipo 1, precedidas del papel de las células T $\gamma\delta$, en el establecimiento de una respuesta de anticuerpos tipo 1. (Naiman, *et al.*, 2002). Sin embargo, la respuesta por las células T $\gamma\delta$ (WC1), ocurren en ausencia de CD4 y tienen características de una respuesta de memoria (Naiman, *et al.*, 2002). Por otro lado, también es posible ver un efecto contrario, en donde las células T $\gamma\delta$, pueden afectar negativamente las respuesta a los antígenos en rumiantes de las células T CD4 (Naiman, *et al.*, 2002).

La activación de células $\gamma\delta$, pueden polarizar la respuesta inmune de acuerdo al antígeno que se presente, por ejemplo en condiciones de infecciones parasitarias las células $\gamma\delta$ inducen la expresión de una respuesta Th2 (IL-4), pero en casos de infecciones bacterianas la respuesta que inducen es Th1 (IFN- γ) (Broek van den, *et al.*, 2005), en este trabajo se encontró una actividad importante de WC1, que es un marcador para la población de linfocitos $\gamma\delta$.

Los antígenos de *Brucella ovis*, estimulan tanto las poblaciones de CD4 y CD8, (Montaña, *et al.*, 1998), los antígenos presentados a través de las moléculas de MHC I, implican la participación de linfocitos CD8. Un indicativo de respuesta Th 1 son los valores elevados de IFN γ , niveles de IgG 2; estimulación de la población de linfocitos CD4, y de linfocitos CD8, ante la presentación de péptidos de proteínas de membrana externa con la participación de anticuerpos contra estas proteínas (Montaña, *et al.*, 1998). En este trabajo se observa el incremento de la población de CD8, y CD4 respecto a lo que ocurre con los carneros del grupo control, lo que concuerda con una respuesta inmune de tipo celular, y en un a infección crónica como lo es e caso de la Brucelosis ovina.

La *Brucella abortus* que inhibe la presentación y procesamiento de los antígenos a los linfocitos T, este mecanismo podría explicar cómo los macrófagos que contienen a la *Brucella*, pueden evitar la vigilancia inmunológica del MHC II de los linfocitos CD4 que producen IFN- γ , promoviendo así la infección crónica (Barrionuevo, *et al.*, 2011), este mecanismo podría estar presente y ser similar en el caso de otras bacterias tales como *Brucella ovis* (Silva, *et al.*, 2013).

Además, los antígenos específicos según las sustancias reportadas a los CD8 responden durante la infección crónica con mensajes citotóxicos. (Orlik y Splitter, 1996). Se sabe que en esos casos, los CD4, incrementan casi el doble mientras que CD8 y las células B disminuyen, entonces CD4, representan la principal población responsable de la proliferación de anticuerpos contra el antígeno (Orlik y Splitter, 1996). La respuesta a linfocitos T, depende de

las moléculas que presenten los MHC II de las células presentadoras de antígenos (APC's) (Kleinschmidt, *et al.*, 2008)

El papel preciso de las poblaciones de CD4 y CD8 durante las infecciones de *Brucella abortus*, no están claras. Por ejemplo se ha mencionado la importancia de linfocitos T CD8 y sin implicaciones de linfocitos T CD4 y MHC II (Vitry, *et al.*, 2012). El papel protector de MHC II dependiente de los linfocitos CD 4, durante la fase crónica de la infección. El IFN- γ fue producido tanto por linfocitos T CD4 y CD8 durante los primeros 5 d post infección, sin embargo sólo la población de linfocitos CD4 continúan los siguientes 10 días post infección no así en el caso de los CD8 (Vitry, *et al.*, 2012). En este estudio se encontraron amplias interrelaciones entre las poblaciones de linfocitos T CD4 y T CD8, sobre todo en el grupo de carneros que se desafiaron por la vía endovenosa, lo que pudo deberse a que con esa vía se mantienen cantidades importantes de bacterias con amplias posibilidades de establecerse y llegar a diferentes órganos del hospedero. En este trabajo se observa una población de linfocitos CD4 y CD8 mayor a las correspondientes encontradas en el grupo control, lo que refleja el establecimiento la cronicidad de la infección en los carneros expuestos al inóculo.

La susceptibilidad del hospedero a la brucelosis no se debe al desarrollo de una respuesta Th2 sino que es por la capacidad menor del hospedero a generar una respuesta Th1 (Vitry, *et al.*, 2012). En este caso se sabe que, *B. ovis* es una bacteria intracelular facultativa que induce un perfil de linfocitos T Th1 en ovinos, por lo tanto, éstos, promueven la activación IL-2 e IFN- γ (Murillo, *et al.*, 2002).

La subpoblación Th 1 asiste en la respuesta inmune celular y responde secretando citoquinas, incluyendo Interleucina 2 (IL-2) e interferón γ (IFN- γ) que contribuyen a la generación de opsoninas de isotipo Ig G₂. La subpoblación Th 2, asiste preferentemente en la respuesta humoral secretando citoquinas tales como inteleucina 4 (IL-4) e interleucina 10 (IL-10). Así que en el proceso de la progresión natural de la infección se podrá conducir un balance diferente de respuestas Th1-Th2 para el control de la brucelosis (Zhan y Cheers, 1993; Díaz, *et al.*, 2013). Vitry et al, mostraron el papel clave de IFN- γ que producen las células T CD4 en el control de la brucelosis, así como la poco significativa importancia del papel de las células T CD8 o la inmunidad humoral en la eliminación de la bacteria durante la infección primaria (Silva, *et al.*, 2013). En este estudio, se observa que la relación de la IgG, se incrementa en los carneros infectados vía mucosal lo que corresponde a títulos de IgG en animales expuestos a algún antígeno, sobre todo considerando que esta es la vía normal a través de la cual se pueden exponer los carneros. .

El epitelio del epidídimo, contiene linfocitos T, y entre ellas los que predominan son los linfocitos CD4 en todas las regiones del epidídimo; el intersticio del órgano podría funcionar como un reservorio leucocitario del epitelio, aunque en condiciones normales no debería ser un sitio de síntesis de inmunoglobulinas (Flinckinger, *et al.*, 1997).

La gran cantidad de linfocitos CD4, podrían representar linfocitos Th o linfocitos supresores para evitar una actividad autoinmune (Flinckinger, *et al.*, 1997), sin embargo tras un evento inflamatorio, o bajo condiciones patológicas donde exista una obstrucción en los ductos, como en el caso de una infección causada por *Brucella ovis*, los espermatozoides podrían salir y ser presentados a los linfocitos B localizados en los nódulos linfoides y ser reclutados en el epidídimo. En el caso de ovinos se presenta la misma disposición pero la cantidad de linfocitos es menor que en el caso de humanos (Hedger, 1997).

Las células T CD8 en bovinos, son poblaciones heterogéneas; TCR (γ/δ) las células T muestran en su superficie celular CD8 y varían con la edad siendo sólo del 3% en animales jóvenes y hasta del 38% en animales adultos mayores de 5 años, lo que podría indicar la afección de la respuesta de memoria en animales de diferente edad y su correlación con mayor o menor defensa inmune de los carneros a alguna infección, (Hogg, *et al.*, 2011), como podría ser el caso de la causada por *B. ovis*. En donde los carneros que presentan lesiones menos pronunciadas, podría deberse a que tal vez éstos montaron una respuesta inmune efectiva, o bien que ésta respuesta se relacione con la edad de los animales por la proporción de linfocitos $\gamma\delta$ (Begg, *et al.*, 2011; Silva, *et al.*, 2015), o bien se presente una infección de tipo abortiva (Burgess, *et al.*, 1982). Las relaciones que se encontraron en este estudio, de las diferentes poblaciones de linfocitos T CD4, T CD8 y T $\gamma\delta$ concuerdan con estudios del establecimiento de la respuesta inmune a diferentes tipos de Brucellas, lo que podría ocurrir de manera similar en el caso de la infección por *Brucella ovis*.

En este estudio se observaron diferencias en las MIF por citometría de flujo en la inmunotipificación de poblaciones de linfocitos CD4 y CD8, se observaron diferencias ($p < 0,05$) entre el grupo control y el grupo endovenoso a los 120dPI, y entre el grupo control y los grupos mucosal y endovenoso a los 189 dPI ($8p < 0,05$), lo que muestra la importancia de dichas poblaciones para el control de la infección crónica de *Brucella ovis* en el hospedero, por otro lado se observó una fluctuación durante los 120, 150 y 189 dPI en ambas poblaciones.

CONCLUSIONES

En este estudio se demostró que las vías utilizadas para el desafío de la *B. ovis* en carneros permitieron el desarrollo de una infección que estimuló el desarrollo de una respuesta inmune, así como la concentración del inoculo usado, fue el adecuado para que los carneros desafiados con *B. ovis* se infectaran y montaran una respuesta inmune.

La prueba de ELISA usada durante el desarrollo del trabajo experimental, resultó ser mejor para el diagnóstico oportuno de una infección incipiente causada por *B. ovis*; ésta prueba serológica, mostró además que en el caso de carneros sospechosos, lo que ocurre a menudo en condiciones de campo, se debe correr una prueba más para descartar algún resultado sospechoso. En tanto que la prueba de IGDA, aunque está recomendada para llevar a cabo trabajos encaminados a diagnosticar y controlar la Brucelosis ovina, no es la mejor para los casos de infecciones tempranas, como si lo es el caso de la prueba de ELISA; esta última debería ser usada a nivel de campo para mejorar el diagnóstico y control de la brucelosis ovina de los carneros.

La eliminación de *B. ovis*, durante la infección crónica es intermitente, de manera que los eyaculados de los carneros infectados, no siempre permiten un diagnóstico adecuado por medio del laboratorio de bacteriología o PCR.

La citometría de flujo, es una herramienta que puede ser usada para indagar sobre el desarrollo de la respuesta inmune sin embargo, aún hacen falta más estudios con el empleo de dicha tecnología para conocer más sobre las diferentes relaciones que se presentan en infecciones crónicas como es el caso de la *B. ovis*, y las diferentes interrelaciones que ocurren con el sistema inmune, sobre todo en diferentes etapas del proceso con que cursa la enfermedad.

La respuesta inmune juega un papel determinante para el control de la Brucelosis ovina, sin embargo una vez que el hospedero ha montado una respuesta contra la bacteria, los productos de la respuesta en mención causan daños irreversibles en la estructura del tejido reproductivo de los carneros, de tal manera, que para el control de la enfermedad en los sistemas de producción ovina, es importante establecer estrategias que permitan un diagnóstico oportuno e integral para evitar pérdidas innecesarias, a causa de una falla en la fertilidad de los hatos.

LITERATURA CITADA

- Acha, N. P., y Szyfres, B. (2001). Brucelosis. En *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales* (Vol. I, págs. 28-55). Buenos Aires, Argentina: Organización Panamericana de la Salud.
- Acosta Dibarrat, J., Díaz Aparicio, E., Arellano Reynoso, B., Tenorio Gutiérrez, V., y Tórtora Pérez, J. (2006). Inducción experimental de epididimitis en ovinos, por inoculación intrauretral con *Actinobacillus seminis*: estudio bacteriológico, serológico e histopatológico. *Tec Pecu Mex*, 44(2), 257-267.
- Acosta Dibarrat, J., Díaz Aparicio, E., Tenorio Gutiérrez, V., Suárez Güemes, F., y Tórtora Pérez, J. (2007). Determination of pathological changes in reproductive tract, IgG, IgM and IgA antibodies in blood, seminal plasma and smegma of rams inoculated with *Actinobacillus seminis*. *J Anim Vet Adv*, 6(1), 105-113.
- Al-Katib, W., y Dennis, S. (2007). Epididymal and testicular lesions in rams following experimental infection with *Actinobacillus seminis*. *New Zeal Vet J*, 55(3), 125-129.
- Alton, G. (1988). *Brucella ovis*. En *Techniques for the Brucellosis laboratory*. Paris: INRA.
- Anastasiadou, M., Avdi, M., y Michailidis, G. (2013). Expression of avian β -defensins and Toll-like receptor genes in the rooster epididymis during growth and Salmonella infection. *Anim Reprod Sci*, 140, 224-231.
- Arellano-Reynoso, B., Lapaque, N., Salcedo, S., G, B., Ciocchini, R., Ugalde, R., Moreno, E., Moriyón, I., Gorvel, J. (2005). Cyclic beta-1,2 glucan is *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nat. Immunol*, 6, 618-625.
- Azevedo de Paula Antunes, M. J., Allendorf, S., Apolinario, C., Quevedo, C., Ripamonte, F., Buratini, J., Baños, J.V.; Kocan, K. M.; de la Fuente, J.; Mejid, J. (2013). Rough virulent strain of *Brucella ovis* induces pro- and anti-inflammatory cytokines in reproductive tissues in experimentally infected rams. *Vet Microbiol*, 161, 339-343.
- Bailey, C., Pasket, M., Matthews, N., y Stenquist, N. (1985). Prevalence and causes of ram epididymitis in Utah. *JAVMA*, 33, 375-383.
- Barrionuevo, P., Victoria, D. M., Velásquez, L. N., García Samartino, C., Coria, L. M., Ibañez, A. E., Cassataro, J.; Giambartolomei, G. H. (2011). *Brucella abortus* inhibits IFN- γ induced Fc γ RI expression and Fc γ RI-restricted phagocytosis via toll-like receptor 2 on human monocytes/macrophages. *Microbes Infect*, 13, 239-250.
- Beeman, K. B., Hummels, S., y Rahaley, R. (1982). Epididymitis in rams. *Agripractice*, 11, 1647-1650.

- Begg, D., de Silva, K., Carter, N., Plain, K., Purdie, A., y Whittington. (2011). Does a Th1 over Th2 dominancy really exist in the early stages of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infections? *Immunobiology*, 216, 840-846.
- Birbestein, E., McGowan, B., Olander, H., y Kennedy, P. (1964). Epididymitis in rams. Studies in pathogenesis. *Cornell Vet*, 54, 25-41.
- Blasco, J., Marín, C., Barberán, M., Moriyón, I., y Díaz, R. (1987). Immunization with *Brucella melitensis* rev 1 against *Brucella ovis* infection of rams. *Vet Microbiol*, 14, 381-392.
- Broek van den, A., Huntley, J., Mackellar, A., Machell, J., MA, T., y HRP, M. (2005). Characterisation of lesional infiltrates of dendritic cells and T cell subtypes during primary infestation of sheep with *Psoroptes ovis*, the sheep scab mite. *Vet Immunol Immunopat*, 105, 141-150.
- Brown, G., pietz, D., y DA, P. (1973). Studies on the transmission of *Brucella ovis* infection in rams. *Cornell Vet*, 63, 29-40.
- Buddle, M. (1983). Studies on *Brucella ovis*, a cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia. *J Hyg*, 54, 351-364.
- Bulgin, M. S., y Anderson, B. C. (1983). Association of sexual experience with isolation of various bacteria in cases of ovine epididymitis. *JAVMA*, 182(4), 372-374.
- Bulgin, M. S., Bruss, M. L., y Anderson, B. C. (1990). Methods for control of lamb epididymitis in large purebred flocks. *AVMA*, 196(7), 1110-1115.
- Burgess, G. (1982). Ovine contagious epididymitis: a review. *Vet Microbiol*, 7, 551-575.
- Burgess, G., McDonald, J., y Norris, M. (1982). Epidemiological studies on ovine brucellosis in selected ram flocks. *Aust Vet J*, 59(2), 45-47.
- Carrera, C. J., Echavarría, C. F., Arechiga, F. C., Bañuelos, V., y Tórtora, P. J. (2013). Consideraciones epidemiológicas en la prevalencia de *Brucella ovis* en Zacatecas México. *Rev Mex Cienc Pecu*, 1(4), 61-74.
- Carvalho, J., Moustacas, V., Xavier, M., Costa, E., Costa, L., Silva, T.M.A.; Paixão, T. A.; Borges, A. M.; Gouveia, A.M.G.; Santos, R. (2012). Andrological, pathologic, morphometric findings in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. *Small Ruminant Res*, 102, 213-222.
- Cloekaert, A. (2002). Major outer membrane proteins of *Brucella spp*: past, present and future. *Vet Microbiol*, 90, 229-247.
- Costa, E., Sant' Ana, F., Carvalho, C., Moustacas, V., Silva, S., Paixão, T. A., y Santos, R. (2012). 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 Zootec*, 64, 751-754.

- Costa, L., Nozaki, C., Lira, N., Antunes, J., Xavier, M., Costa, E. P., Paixão, T. A., Santos, R. L., Megid, J. (2013). Species-specific nested PCR as a diagnostic tool for *Brucella ovis* infection in rams. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 65(1), 55-60.
- Cuevas, P. (2008). Demostración de anticuerpos antiesperma encarneros experimentalmente infectados con *Actinobacillus seminis*. *Memoria AMTEO*, 1-3.
- da Costa, M., Gamazo, C., Sánchez-Martínez, M., Barberán, M., Peñuelas, I., e Irache, J. (2012). Conjunctival vaccination against *Brucella ovis* in mice with mannosylated nanoparticles. *Journal Controlled Release*, 162, 553-560.
- de la Puente-Redondo, V., García del Blanco, N., Pérez-Martínez, C., González-Rodríguez, M., Rodríguez-Ferri, E., y Gutiérrez-Martín, C. (2000). Isolation of *Actinobacillus seminis* from the Genital tract of Rams in Spain. *J. Comp Path*, 122, 217-222.
- Díaz, A. C., Paolicci, F., Fiorentino, M., Gherzi, G., Zylberman, V., Goldbaum, F., y Estein, S. (2013). Immune response and serum bactericidal activity against *Brucella ovis* elicited using a short immunization schedule with the polymeric antigen BLSOmp31 in rams. *Vet Immunol Immunop*, 154, 36-41.
- Díaz-Aparicio, E., Tenorio-Gutiérrez, V., Arellano-Reynoso, B., Enríquez-Verdugo, I., y Aguilar-Romero, F. (2009). Pathogenicity of different strains of *Histophilus somni* in the experimental induction of ovine epididymitis. *Can J Vet Res*, 73, 167-170.
- Dostál, J. (1995). Immunosuppressive effect induced by intraperitoneal and rectal administration of boar seminal immunosuppressive factor. *Biol Reprod*, 52, 1209-1214.
- Dostál, J. (1997). Inhibition of bacterial and boar epididymal sperm immunogenicity by boar seminal immunosuppressive component in mice. *J Reprod Fertil*, 111, 135-141.
- Eskra, L., Mathison, A., y Splitter, G. (2003). Microarray analysis of mRNA levels from RAW264.7 macrophages infected with *Brucella abortus*. *Infect Immun*, 71, 1125-1133.
- Estein, S. (1999). Aspectos inmunológicos en el diagnóstico y control de la epididimitis contagiosa del carnero por *Brucella ovis*. *Arch Med Vet*, 31, 5-17.
- Estein, S., Fiorentino, M., Paolicchi, F., Clause, M., Manazza, J., Cassataro, J., giambartolomei, G. H., Coria, L. M., Zylberman, V., Fossati, C. A., Kjekken, R., Goldbaum, F. (2009). The polymeric antigen BLSOmp31 confers protection against *Brucella ovis* infection in rams. *Vaccine*, 27, 6704-6711.
- Estes, D., y Brown, W. (2002). Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. *Vet Immunol Immunopat*, 90(1-2), 1-10.
- Faraway, J. (2006). Generalized linear models. En T. F. Group (Ed.), *Texts in statistical science. Extending the linear model with R generalized linear, mixed effects and nonparametric regression models* (págs. 126-148). Boca Raton, EUA: Chapman Hall/CRC.

- Ferre, I., Aduriz, G., del-Pozo, I., Regidor-Cerillo, J., Atxaerandio, R., Collantes-Fernández, E., Ugarte-Garagalza, C., Ortega-Mora, L. M. (2005). Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. *Theriogenology*, 63, 1504-1518.
- Ficapal, A., J. J., Blasco, J., y Moriyón, I. (1998). Diagnosis and epidemiology of *Brucella ovis* infection in rams. *Small Ruminant Res*, 29, 13-19.
- Finlay, B. B., y McFadden, G. (2006). Anti-immunology: evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. *Cell*, 124, 767-782.
- Flinckinger, C., Bush, L., Howards, S., y Herr, C. J. (1997). Distribution of leukocytes in the Epithelium and Interstitium of Four Regions of the Lewis Rat Epididymis. *Anat Record*, 248, 380-390.
- Foster, R. L. (1988). Immunoglobulins and immunoglobulins-contain cells in the reproductive tract of normal rams. *Aust Vet J*, 65, 16-20.
- Foster, R., Ladds, P., AJ, H., y Hoffman, D. (1988). Immunoglobulins and immunoglobulins-contain cells in the reproductive tract of rams naturally infected with *Brucella ovis*. *Aust Vet J*, 65, 37-40.
- França, S., Mol, J., Costa, E., Silva, A., Xavier, M., Tsolis, R. R., Reis, J. K. P., Paixão, T. A., Santos, R. (2011). Indirect ELISA for diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 66(6), 1695-1702.
- 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. (2009). Differential expression of inflammatory and immune response genes in rams experimentally infected with a rough virulent strain of *Brucella ovis*. *Vet Immunol Immunop*, 127, 295-303.
- Godfroid, J. (2011). Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21 st century. *Prev Med Vet*, 102(2), 118-131.
- Gomes, C., Costa, M., Acevedo, V., y Costa, O. (2006). *Brucella spp* noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microbial Cell Factories*, 5, 1-11.
- González, M. (1994). *Brucella ovis* infection in two flocks of sheep. *Vet Rec*, 135, 254-256.
- Gouletsou, P., y Fthenakis, G. (2010). Clinical evaluation of reproductive hability of rams. *Small Ruminant Res*, 92, 45-51.
- Grilló, M., Marin, C., Barberán, M., de Miguel, M., Larocau, K., Jaques, I., y Blasco, J. (2009). Efficacy of bp 26 and bp 26/omp 31 *B. Mellitensis* rev 1 deletion mutants against *Brucella ovis* in rams. *Vaccine*, 27, 187-191.
- Hedger, M. P. (1997). Testicular leukocytes: what are they doing? *Rev Rep*, 2, 38-47.
- Hogg, A. E., Parsons Keith, T. G., Worth, A. B., Howard, C. J., y Villarreal-Ramos, B. (2011). Characterization of age-related changes in bovine CD8+ T-cells. *Vet Immunol Immunop*, 140(1-2), 47-54.

- Huges, K. (1972). Experimental *Brucella ovis* infection in ewes. Correlation of infection and complement fixation titres. *Aust Vet J*, 48, 18-22.
- Hungerford, T. (1975). Brucellosis. En *Diseases of livestock* (Octava edición ed.). Sidney, Australia: Mc Graw-hill.
- Jiménez de Bagüés, M. (1994). Protective immunity to *Brucella ovis* in balb/c mice following recovery from primary infection or immunization with subcellular vaccines. *Infect Immun*, 62, 632-638.
- Jiménez de Bagüés, M., Barberán, M., Marin, C., y Blasco, J. (1995). The *Brucella abortus* RB51 vaccine does not confer protection against *Brucella ovis* in rams. *Vaccine*, 13(3), 301-304.
- Jiménez de Bagüés, M., Elzer, P., Jones, S., Blasco, J., Enright, F., Schuring, G., y Winter, A. (1994). Vaccination with *Brucella abortus* rough mutant RB51 protects BALB/c mice against virulent strains of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, and *Brucella ovis*. *Infect Immun*, 62, 4990-4996.
- Jimenez de Bagüés, M., S, D., Dornand, J., y Gross, A. (2005). Cellular bioterrorism: how *Brucella* corrupts macrophage physiology to promote invasion and proliferation. *Clin Immunol*, 114, 227-238.
- Kimberling, C. (1987). *Brucella ovis*. En J. a. Swifts (Ed.), *Diseases of sheep*. Lea y Febiger.
- Kleinschmidt, S., Meneses, F., Nolte, I., y Hewicker-Trautwein, M. (2008). Distribution of mast cell subtypes and immune cell populations in canine intestines: Evidence for age-related decline in T cells and macrophages and increase of IgA-positive plasma cells. *Res Vet Sci*, 84, 41-48.
- Ley, W. B. (1993). Ram epididymitis review and control. *Agripractice*, 14(5), 34-37.
- Littell, R., Henry, P., y Ammerman, C. (1998). Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J Anim Sci*, 76, 1216-1231.
- Luckheeram, R., Zhou, R., Verma, A., y Xia, B. (2012). CD4 T cells: Differentiation and functions. *Clin Develop Immunol*, 2012, 1-12.
- Lun, S., Stro, G., Magnusson, U., y Östensson, K. (2007). Total and differential leucocyte counts and lymphocyte subpopulations in lymph, afferent and efferent to the supramammary lymph node, during endotoxin-induced bovine mastitis. *Reprod Dom Anim*, 42, 126-134.
- Marion, G. (2007). Quality control in flow cytometry. En *Flow cytometry principles and applications*. New Jersey: Human Press Inc.
- Mcghee, J., y Kiyono, H. (1999). The mucosal immune system. En W. EP (Ed.), *Fundamental Immunology* (Cuarta ed., págs. 909-945). Philadelphia, USA: Lippincott-Reven.

- Mesquita, J., Pereira, A., Takao, C., Silva, S., Wilson de Melo, C., Coelho, A., y Pereira da Silva, N. (2010). Immune system-Part II Basis of the immunological response mediated by T and B lymphocytes. *Bras J Rheumato*, 50(5), 552-580.
- Mestecky, J., Raska, M., Novak, J., Alexander, R., y Moldoveanu, Z. (2010). Antibody-mediated protection and the mucosal immune system of the genital tract: Relevance to vaccine design. *J Reprod Immunol*, 85(1), 81-85.
- Moldoveanu, Z., Huang, W., Kulhavy, R., Plate, M., y Mestecky, J. (2005). Human male genital tract secretions: both mucosal and systemic immune compartments contribute to the humoral immunity. *J Immunol*, 175, 4127-4136.
- Montaña, N., Rueda, O., Calderon, C., Ortega, A., Puentes, A., Gallego, M., y Mariño, O. (1998). Medición de respuesta inmune humoral y celular frente a antígeno de *Brucella abortus* RB51 en bovinos. *Arch Med Vet*, 30(2), 1-17.
- Moreno, E., Cloeckert, A., y Moriyón, I. (2002). *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet Microbiol*, 90, 209-227.
- Moustakas, V., Silva, T., Costa, E., Costa, L., Paixão, T., y Santos, R. (2015). Real-time PCR for detection of *Brucella ovis* and *Histophilus somni* in ovine urine and semen. *Arg Bras Med Vet Zootec*, 67(6), 1751-1755.
- Murillo, M., Goñi, M., Irache, J., Arangoa, M., Blasco, J., y Gamazo, C. (2002). Modulation of the cellular immuneresponse after oral or subcutaneous immunization with microparticles containing *Brucella ovis* antigens. *J Control Release*, 85, 237-246.
- Naiman, B. M., Blumerman, S., Alt, D., Bolin, C. A., Brpwn, R., Zuerner, R., y Baldwin, C. L. (2002). Evaluation of type 1 Immune response in naïve and vaccinated animals following challenge with *Leptospira brgpetersenii* Serovar *Hardjo*: Involvement of WC1+ $\gamma\delta$ and CD4 T Cells. *Infect Immun*, 70(11), 6147-6157.
- Nakada, N., Cavalcanti de Lira, N., Filho, O., Costa, A., Rodello, L., Gaudérico, D., Dimas, B. S., Acevedo de Paula Antunez, J. M., Megid, J. (2011). Rapid serum agglutination and agar gel immunodiffusion tests associated to clinical signs in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. *Ciencia Rural*, 41(8), 1441-1446.
- OIE. (julio de 2009). *Codigo sanitario para los animales terrestres*. Recuperado el 20 de julio de 2011, de www.oie.int/doc/ged/D7599.pdf
- Orlik, O., y Splitter, G. (1996). Progression to persistent lymphocytosis and Tumor development in bovine leukemia virus (BLV)-infected cattle correlates with impaired proliferation of CD4+ T cells in response to gag- and env-Encoded BLV proteins. *J Virol*, 70(11), 7584-7592.
- Palomares, G., Aguilar, F., Hernández, L., Acosta, J., Herrera, E., y Tenorio, V. (2005). Isolation and characterization of *Haemophilus somnus* (*Histophilus somni*) present in semen of rams with epididymitis. *Small Ruminant Res*, 60(3), 221-312.

- Paolicchi, F., Casaro, P., Gimeno, E., Kortebani, G., y Mazzolli, A. (2000). Antisperm response in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. *Small Ruminant Res*, 36, 7-15.
- Paolicchi, F. (1991). Estudio comparativo de medios de cultivo para aislar *Brucella ovis*. *Rev Argent Microbiol*, 23, 155-159.
- Paolicchi, F. (14 de noviembre de 2011). *Aislamiento de Brucella ovis del tracto genital y leche de ovejas con persistencia de títulos positivos a ELISA*. Recuperado el 22 de noviembre de 2014, de www.produccionbovina.com/.../58-OvisVersion%20Argentina.pdf:http://produccionbovina.com/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/enfermedades_reproduccion/58-Ovis%version%20Argentina.pdf
- Paolicchi, F., Nuñez, M., Fiorentino, M., Malena, R., Trangoni, M., Crevero, S., y Estein, S. M. (2013). Respuesta humoral y consecuencias reproductivas en ovejas desafiadas con *Brucella ovis* al final de la gestación. *Rev Argent Microbiol*, 45(1), 13-20.
- Penn, D. (2002). Major histocompatibility complex (MHC). En M. P. Ltd (Ed.), *Encyclopedia of life sciences* (págs. 1-7). Nature Publishing group. www.els.net.
- Picard-Hagen, N., Berthelot, X., Champion, J., Eon, L., Lyazrhi, F., Marois, M., Peglion, M., shuster, A., Trouche, A., Garin-Bastuji, B. (2015). Contagious epididymitis due to *Brucella ovis*: relationship between sexual function, serology and bacterial shedding in semen. *BMC Vet Res*, 11(25), 1-7.
- Plant, J., Eamens, G., y Seaman, J. (1986). Serological, bacteriological and pathological changes in rams following different routes of exposure to *Brucella ovis*. *Aust Vet J*, 63(12), 409-412.
- Praud, A., Champion, J., Yannick, C., Drapeaud, A., Meyer, L., y Garin-Bastuji, B. (2012). Assessment of diagnostic sensitivity and specificity of an indirect ELISA kit for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *BMC Vet Res*, 8, 68.
- Profepa. (8 de septiembre de 2016). <https://www.gob.mx/profepa/documentos/norma-oficial-mexicana-nom-033-sag-zoo-2014-metodos-para-dar-muerte-a-los-animales-domesticos-y-silvestres>. Recuperado el 25 de junio de 2018, de <https://www.gob.mx/profepa/documentos/norma-oficial-mexicana-nom-033-sag-zoo-2014-metodos-para-dar-muerte-a-los-animales-domesticos-y-silvestres>
- Ridler, A., & West, D. (2002). Effects of *Brucella ovis* infection on semen characteristics of 16-month-old red deer stags. *New Zea Vet J*, 50(1), 19-22.
- Ridler, A., y West, D. (2011). Control of *Brucella ovis* infection in sheep. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 1, 61-66.
- Ridler, A., Smith, S., y West, D. (2013). Seroconversion and semen shedding in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. *New Zea Vet J*, 10, 1-4.
- Robles, C. (1998). Epididimitis contagiosa de los caneros por *Brucella ovis*. *Rev Med Vet*, 79(1), 67-75.

- Santos, L. T. L., Pinto, S. S., y Gorvel, J-P. (2013). *Brucella* T4SS: the VIP pass inside host cells. *Curr Opin Microbiol*, 16, 1-7.
- Saravanamuthu, V., Foster, R., y Ladds, P. (1991). T and B lymphocyte subsets in spermatoc granulomas in five Rams. *Vet Pathol*, 28, 482-491.
- Saunders, V., Reddacliff, L., y Hornitzky, M. (2007). Multiplex PCR for the detection of *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* and *Histophilus somni* in ram semen. *Aust Vet J*, 85, 72-77.
- Silva, A. P., Macêdo, A. A., Costa, L. F., Rocha, C. E., García, N. N., Farias, J. R., Gomes, P. P. R., Texeira, G. G., Fonseca, K. W. J., Maia, A. R. F., Neves, G. G., Romão, E. L., Silva, T. M. A., Mol, J. P. S., Oliveira, R. M., Araújo, M. S. S., Nascimento, E. F., Martins-Filho, O. A., Brandão, H. M., Paixão, T. A., Mol, J. (2015). Encapsulated *Brucella ovis* lacking a putative ATP-binding cassette transporter (AabcBA) protects against wild type *Brucella ovis* in rams. *Plos One*, 10.1371, 3-18.
- Silva, A., Macêdo, A., Costa, L., Turchetti, A., Bull, V., Pessoa, M., Araújo, M. S., Nascimento, E. F., Martins-Filho, O. A., Paixão, T. A., Santos, R. (2013). *Brucella ovis* lacking a species-specific putative ATP-binding cassette transporter is attenuated but immunogenic in rams. *Vet Microbiol*, 167, 546-553.
- Troncoso, T. I., J, G. A., Navarrete, A. F., Lagos, M., y Fisher, W. (2014). Comparación entre Palpación Testicular y ELISA Indirecto en el diagnóstico de la brucelosis ovina. *Rev Inv Vet Peru*, 25(4), 557-561.
- Vasselon, T., y Detmers, A. P. (2002). Toll Receptors: a central element in innate immune responses. *Infec Immun*, 70(3), 1033-1041.
- Vitry, M. A., De Trez, C., Goriely, S., Dumoutier, L., Akira, Sh., Ryffel, B., Carlier, Y., Letesson, J-J., Muraille, E. (2012). Crucial role of gamma interferon-producing CD4+Th 1 cells but dispensable function of CD 8+ T Cell, Th 2, and Th 17 responses in the control of *Brucella mellitensis* infection in mice. *Infec Immun*, 80(12), 4271-4280.
- Xavier, M., Silva, T., Costa, E., Paixão, T., Moustacas, V., Carvalho, J., Sant'Anna, F. M., Robles, C. A., Gouveia, A. M. G., Lage, A. P., Tsolis, R. M., Santos, R. (2010). Development and evaluation of a species-specific PCR assay for the detection of *Brucella ovis* infection in rams. *Vet Microbiol*, 145, 158-164.
- Zhan, Y., y Cheers, C. (1993). Endogenous gamma interferon mediates resistance to *Brucella abortus*. *Infect Immun*, 61, 4899-4901.