

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO.



**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA.**



DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO.

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE MAESTRO EN DESARROLLO
TECNOLÓGICO Y SISTEMAS DE PRODUCCIÓN ANIMAL.**

**EVALUACIÓN DE LESIONES HISTOPATOLÓGICAS DEL APARATO
REPRODUCTOR DE LOS CARNEROS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE
CON *Brucella ovis*.**

PRESENTA:

MVZ. ADRIÁN SÁNCHEZ OROZCO.

TUTORES:

Dr. VÍCTOR MANUEL SÁNCHEZ PARRA.

MC. MANUEL LÓPEZ RODRÍGUEZ.

Morelia, Michoacán. Agosto 2022.

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO.



**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA.**



DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO.

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE MAESTRO EN DESARROLLO
TECNOLÓGICO Y SISTEMAS DE PRODUCCIÓN ANIMAL.**

**EVALUACIÓN DE LESIONES HISTOPATOLÓGICAS DEL APARATO
REPRODUCTOR DE LOS CARNEROS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE
CON *Brucella ovis*.**

PRESENTA:

MVZ. ADRIÁN SÁNCHEZ OROZCO.

SÍNODO

DR. MANUEL JAIME TENA MARTÍNEZ

DR. DANIEL VAL ARREOLA

MC. RUY ORTIZ RODRÍGUEZ

MC MANUEL LÓPEZ RODRÍGUEZ

DR. VÍCTOR MANUEL SÁNCHEZ PARRA

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis compañeros y amigos que me apoyaron en la realización de esta Tesis: Dr. Víctor Manuel Sánchez Parra, MCS. Manuel López Rodríguez, MC. Ruy Ortiz Rodríguez, QFB. Claudia Guzmán Calderón, Dr. Daniel Val Arreola, Dr. Manuel Jaime Tena Martínez, y la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

“Muchas gracias”.

ÍNDICE.

ÍNDICE DE IMÁGENES.	i
ÍNDICE DE TABLAS.	iii
ÍNDICE DE GRAFICAS.	iv
RESUMEN.	1
SUMMARY.	3
INTRODUCCIÓN.	5
1. ANTECEDENTES.	9
1.1. Descubrimiento e historia del género <i>Brucella</i>	9
1.2. Producción de ovinos y su relación con <i>Brucella ovis</i> en México.	10
1.3. Características del género <i>Brucella ovis</i>	12
1.4. Estructura y composición química.	14
1.4.1. Estructura externa.	14
1.4.2. Estructura interna.	15
1.5. Propiedades bioquímicas.	16
1.6. Etiología de la epididimitis infecciosa de los carneros.	16
1.7. Identificación del agente etiológico.	17
1.8. Epidemiología.	18
1.9. Transmisión y patogenia.	19
1.10. Lesiones macroscópicas.	21
1.11. Lesiones microscópicas.	21
1.12. Diagnóstico clínico.	22
1.13. Diagnóstico de laboratorio.	22
1.14. Signología.	23
1.15. Diagnóstico diferencial.	24
1.16. Prevención y control.	24
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	26
3. JUSTIFICACIÓN.	27
4. HIPÓTESIS.	28

5. OBJETIVOS.....	29
5.1. Objetivo general.....	29
5.2. Objetivos particulares.....	29
6. MATERIALES Y METODOS.....	30
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
8. CONCLUSION.....	41
9. BIBLIOGRAFÍA.....	42
10. ANEXO DE TINCIONES.....	49
11. ANEXO DE RESULTADOS.....	57
12. ANEXO: IMÁGENES HISTOLÓGICAS DE LAS LESIONES.....	60

ÍNDICE DE IMÁGENES.

FIGURA 1. ESPECIES QUE INTEGRAN EL GÉNERO BRUCELLA, HOSPEDADORES CONOCIDOS Y CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS Y ANTIGÉNICAS QUE PERMITEN CLASIFICARLAS EN BIOVARIEDADES. A Y M: CONFIGURACIONES ALTERNATIVAS DEL PSO, R: LPS DE LAS CEPAS RUGOSAS.....	13
FIGURA 2. MEMBRANA EXTERNA (LPS-S) DE LA PARED CELULAR DE <i>BRUCELLA</i>	15
FIGURA 3. MICROFOTOGRAFÍA 40X DEL CORTE VESÍCULA SEMINAL.....	60
FIGURA 4. MICROFOTOGRAFÍA 10X DEL CORTE DE ÁMPULA.	60
FIGURA 5. MICROFOTOGRAFÍA 4X DEL CORTE TESTÍCULO DERECHO DEL RETE TESTICULAR.....	61
FIGURA 6. MICROFOTOGRAFÍA 10X DEL CORTE TESTÍCULO DERECHO DEL RETE TESTICULAR.....	61
FIGURA 7. MICROFOTOGRAFÍA 10X DEL CORTE TESTÍCULO DERECHO CÁPSULA TESTICULAR.....	62
FIGURA 8. MICROFOTOGRAFÍA 10X DEL CORTE TESTÍCULO DERECHO CÁPSULA TESTICULAR.....	62
FIGURA 9. MICROFOTOGRAFÍA 10X DEL CORTE TESTÍCULO IZQUIERDO RETE TESTICULAR.....	63
FIGURA 10. MICROFOTOGRAFÍA 10X DEL CORTE TESTÍCULO IZQUIERDO RETE TESTICULAR.....	63
FIGURA 11. MICROFOTOGRAFÍA 10X DEL CORTE TESTÍCULO IZQUIERDO CÁPSULA TESTICULAR.....	64
FIGURA 12. MICROFOTOGRAFÍA 10X DEL CORTE TESTÍCULO IZQUIERDO CÁPSULA TESTICULAR.....	64
FIGURA 13. MICROFOTOGRAFÍA 10X CORTE DE LA CABEZA DEL EPIDÍDIMO DERECHO.....	65
FIGURA 14. MICROFOTOGRAFÍA 40X DEL CORTE CABEZA DEL EPIDÍDIMO.	65
FIGURA 15. MICROFOTOGRAFÍA 10X DEL CORTE CUERPO DEL EPIDÍDIMO DERECHO.....	66
FIGURA 16. MICROFOTOGRAFÍA 10X DEL CORTE DEL CUERPO DEL EPIDÍDIMO DERECHO.	66
FIGURA 17. MICROFOTOGRAFÍA 10X DEL CORTE LA COLA DEL EPIDÍDIMO DERECHO.....	67
FIGURA 18. MICROFOTOGRAFÍA 10X DEL CORTE DE LA COLA EPIDÍDIMO DERECHO.....	67

FIGURA 19. MICROFOTOGRAFÍA 40X DEL CORTE EPIDÍDIMO DERECHO COLA.....	68
FIGURA 20. MICROFOTOGRAFÍA 40X DEL CORTE ENDOMETRIAL IZQUIERDO CABEZA.	68
FIGURA 21. MICROFOTOGRAFÍA 10X DEL CORTE CABEZA DEL EPIDÍDIMO IZQUIERDO.....	69
FIGURA 22. MICROFOTOGRAFÍA 10X DEL CORTE EPIDÍDIMO IZQUIERDO CABEZA.	69
FIGURA 23. MICROFOTOGRAFÍA 40X DEL CORTE CUERPO DEL EPIDÍDIMO IZQUIERDO.....	70
FIGURA 24. MICROFOTOGRAFÍA 10X CORTE DEL CUERPO DEL EPIDÍDIMO IZQUIERDO.....	70
FIGURA 25. MICROFOTOGRAFÍA 10X DEL CORTE LA COLA DEL EPIDÍDIMO IZQUIERDO.....	71
FIGURA 26. MICROFOTOGRAFÍA 10X DEL CORTE COLA DEL EPIDÍDIMO IZQUIERDO.....	71
FIGURA 27. MICROFOTOGRAFÍA 100X DEL CORTE DE LA COLA DEL EPIDÍDIMO IZQUIERDO.	72
FIGURA 28. MICROFOTOGRAFÍA 10 X DEL CORTE URETRA PÉLVICA.	73
FIGURA 29. COLA DEL EPIDÍDIMO, BAAR.....	74
FIGURA 30. COLA DEL EPIDÍDIMO, GRAM.....	74

ÍNDICE DE TABLAS.

TABLA 1. DISEÑO EXPERIMENTAL DE LOS CARNEROS INFECTOS EXPERIMENTALMENTE CON BRUCELLA OVIS (CEPA 01ZAC-INIFAP) DE ACUERDO CON EL GRUPO Y VÍA DE INOCULACIÓN.	30
TABLA 2. TIEMPO MÍNIMO PARA DIAGNOSTICAR SEROPOSITIVIDAD Y MÁXIMA SEROPOSITIVIDAD EN BORREGOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON <i>B. ovis</i>	33
TABLA 3. INOCULACIÓN EN MUCOSAS DE <i>B. ovis</i> (01ZAC-INIFAP) EN LA MUCOSA CONJUNTIVAL Y PREPUCIAL.	57
TABLA 4. INOCULACIÓN DE <i>B. ovis</i> (01ZAC-INIFAP) VÍA INTRAVENOSA.	58
TABLA 5. INOCULACIÓN CONJUNTIVAL Y PREPUCIAL CON SOLUCIÓN SALINA DE FOSFATO AL 0,9 %, (CONTROL).	59

ÍNDICE DE GRAFICAS.

GRAFICA 1. COMPORTAMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE CARNE DE OVINO A NIVEL NACIONAL DE ACUERDO CON EL PERIODO 2010 -2019.	11
GRAFICA 2. CABEZA, CUERPO Y COLA DEL EPIDÍDIMO DERECHO E IZQUIERDO INOCULACIÓN POR MUCOSAS.	35
GRAFICA 3. CABEZA, CUERPO Y COLA DEL EPIDÍDIMO DERECHO E IZQUIERDO, INOCULADO POR VÍA ENDOVENOSA.	36
GRAFICA 4. LESIÓN TESTICULAR IZQUIERDA Y DERECHO INOCULADO POR MUCOSAS.	38
GRAFICA 5. LESIÓN TESTICULAR IZQUIERDO Y DERECHO INOCULADO POR VÍA ENDOVENOSA.	38
GRAFICA 6. LESIONES EN GLÁNDULAS ANEXAS INOCULACIÓN POR MUCOSAS.	39
GRAFICA 7. LESIONES EN GLÁNDULAS ANEXAS, INOCULACIÓN POR VÍA ENDOVENOSA.	39

RESUMEN.

La Epididimitis infecciosa de los carneros es una enfermedad producida por bacterias del género *Brucella ovis* (*B. ovis*), es caracterizada por causar infertilidad, se han desarrollado estudios para conocer más respecto a su diagnóstico, por lo que es importante conocer más de las lesiones que produce en el aparato reproductor de los carneros. El trabajo se desarrolló en el área de Histopatología de la Unidad de Servicios Auxiliares para el Diagnóstico (USAD) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, ubicada en la carretera 9,5 de la carretera Morelia–Zinapécuaro, Michoacán, México. Los cortes histopatológicos se evaluaron a partir de tres grupos de carneros: Grupo n=1 Inoculación en mucosa, instilación de inóculo de *B. ovis* (01Zac-INIFAP) en mucosa conjuntival (izquierda) y prepucial con 0.5 mL a una concentración de $3,9 \times 10^9$ Unidades Formadora de Colonias (UFC) en ambas mucosas. Grupo n=2 inoculación de *B. ovis* (01Zac-INIFAP) vía intravenosa administrando 1 mL de inóculo en vena yugular a la misma concentración $3,9 \times 10^9$ UFC. Grupo n=3 control al que se le administró instilación conjuntival (izquierda) y prepucial de solución salina de fosfato (SSF), a razón de 0,5 mL tanto en conjuntiva como en prepucio. El objetivo de este trabajo fue evaluar y describir las lesiones histopatológicas en cortes histológicos del aparato reproductor (ganglio inguinal, vesícula seminal, testículo derecho e izquierdo rete testicular, capsula testicular, glándula bulbo uretral, epidídimo derecho e izquierdo (cabeza, cuerpo y cola), uretra pélvica y ámpulas) y membrana nictitante de carneros infectados experimentalmente con la cepa 01Zac-INIFAP de *B. ovis*., utilizando tinciones de Hematoxilina y Eosina, Gram y BAAR. Los resultados muestran lesiones principalmente unilaterales y los órganos más afectados fueron los epidídimos principalmente en la cola, por otro lado, se encontró que las afecciones en testículos son secundarias a la afección principal en los epidídimos, otros órganos afectados fueron uretras pélvicas y en menor grado tanto la vesícula seminal como el ámpula. Se concluye que la cepa de *B. ovis* 01Zac-INIFAP es capaz de desarrollar lesiones en el aparato reproductor de los carneros infectados por ambas vías.

Así mismo las lesiones histopatológicas en epidídimo pueden ser de varios grados de afección, incluyendo induración, en cuanto al testículo, las lesiones, aunque son leves, causan daño significativo, puesto que incluye adherencias, y este proceso de afectación es secundario al proceso producido en epidídimos. En el caso de las lesiones en el resto de los órganos es generalizado; puesto que las lesiones se encuentran en el 100% de los carneros infectados experimentalmente por ambas vías, aunque si bien, en la infección vía mucosas se presentan el mismo tipo de lesiones, pero con menor severidad, se destaca la presencia de fibrosis en infección experimental con ambas vías de inoculación (mucosa y endovenosa). Finalmente, con la utilización de las técnicas de tinción de bacilos ácido alcohol resistente (BAAR) y la tinción de GRAM se pueden observar artefactos positivos en los epidídimos de carneros infectados experimentalmente con *B. ovis* en ambas vías. Aspecto que, puede complementarse con más investigaciones en torno a esta enfermedad y profundizar en el proceso y en las lesiones causadas por esta enfermedad usando esas técnicas.

Palabras clave: Reproductor, carneros, histopatología, brucelosis.

SUMMARY

Infectious epididymitis of rams is a disease caused by bacteria of the genus *Brucella ovis* (*B. ovis*), it is characterized by infertility, investigations have been developed to know more about its diagnosis, so it is important to know more about lesions caused by *B. ovis* in the reproductive system of rams. This investigation was done in the Histopathology area of the Unit of Auxiliary Services for Diagnosis (UASD) in the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics at the Universidad Michoacán de San Nicolas de Hidalgo, it is located on highway 9,5 Morelia-Zinapécuaro, Michoacán. México. Histopathological studies were evaluated from three groups of rams: Group n=1 Inoculation route mucosal, instillation of *B. ovis* inoculum (01 Zac-INIFAP) in conjunctival (left) and preputial mucosa of 0,5 mL with concentration of $3,9 \times 10^9$ Colony Forming Units (CFU) in both mucosal membranes. Group n=2 Inoculation of *B. ovis* (01 Zac-INIFAP) intravenous route of 1 mL of inoculum un jugular vein at the same concentration $3,9 \times 10^9$ CFU. Control group n=3, received conjunctival (left) and preputial installation of phosphate saline solution (SS), of 0,5 mL in the conjunctival and foreskin routes. The aim of this investigation was to evaluate and describe the histopathological lesions of the reproductive system (inguinal ganglion, seminal vesicle. Right and left epididymis -head, body and tail-, pelvic urethra and ampullae) and nictitating membrane of rams experimentally infected with 01-Zac-INIFAP strain of *B. ovis*. Histological staining was made using Hematoxylin and Eosin, Gram and BAAR stains. The results showed unilateral lesions in the epididymis, this organ was the most damaged, mainly at the tail of the epididymis. On the other hand, it was found that the damages in the testicles were secondary to the damage in the epididymis, other injured organs were the pelvic urethra, and with minor injury for seminal vesicle and ampulla. It is concluded that the strain of *B. ovis* 01 Zac-INIFAP could be able to developing lesions in the reproductive system of rams infected by both routes mucosal and intravenous. Likewise, the histopathological lesions in the epididymis could be various degrees of damage, including induration, as for the testicle, the lesions, although they were slight, were cause of significant damage, since they include fibrosis, and this process is secondary to the process in the epididymis. In the case of lesions in the rest of the organs, it is generalized, since the lesions were

found in one hundred of the rams experimentally infected by both routes, both for one or the other intravenous or mucosal. In these organs, the severity of lesions was less, nevertheless the presence of fibrosis was constant. Finally, with the use of acid alcohol resistant bacteria staining (ARB) and the GRAM stain, positive artefacts can be observed in the epididymis of rams experimentally infected with *B. ovis*, this aspect can be complemented with more research of this disease using these techniques.

Keywords: Reproductive, rams, histopathology, brucellosis.

INTRODUCCIÓN.

Esta investigación forma parte de un proyecto de investigación de Sánchez, 2018, por ello, solo se aborda la evaluación de lesiones histopatológicas del aparato reproductor de los carneros infectados experimentalmente con *Brucella ovis*. En este sentido, tanto la descripción como los hallazgos en las lesiones histopatológicas y su clasificación son relevantes para la explicación de los procesos reproductivos alterados de los carneros y de los rebaños de ovinos que por diferente circunstancia han o están en contacto con este agente patológico.

Es necesario revisar aspectos esenciales en torno a la Brucelosis para comprender y describir de mejor manera las lesiones histopatológicas de carneros infectados experimentalmente con *Brucella ovis*. Al respecto, la Brucelosis es una enfermedad infecciosa causada por bacterias del género *Brucella*, que se caracteriza por ser cocobacilos Gram negativo, sin cápsula, sin flagelo, intracelular facultativa que puede vivir dentro de macrófagos y células epiteliales (García, 1987). En los carneros la brucelosis es causada por *B. ovis* afectándolos principalmente a nivel reproductivo. Esta bacteria (*Brucella ovis*), fue aislada por primera vez en Nueva Zelandia en 1952 a partir de ovejas con falla en la gestación (aborto) y, en 1956, es reportada por primera vez en América (Robles, 1998).

Una vez que la bacteria penetra la mucosa, ésta se disemina por los ganglios linfáticos y el torrente circulatorio, los cambios patológicos son evidentes en los testículos epidídimo y glándulas del aparato reproductor, las primeras lesiones aparecen en la cabeza, cuerpo y cola del epidídimo observando un aumento del tamaño de hasta cuatro veces su volumen normal, de consistencia firme y de forma irregular. Las lesiones microscópicas se observan con edema intersticial, e infiltración perivascular de linfocitos y células plasmáticas, con metaplasia e hiperplasia del epitelio epididimal, y formación de vesículas intraepiteliales (Robles, 1998).

Por la capacidad que tiene *Brucella* para sobrevivir y replicarse dentro de las células del huésped, la califica como bacteria de alta patogenicidad (Galindo *et al.*, 2009; Cloeckaert *et al.*, 2002). A nivel mundial la infección causada por este género bacteriano produce pérdidas económicas importantes en la producción animal, y en el caso de los ovinos específicamente, se ven afectados los productores por conceptos de manejo extra, vacunaciones, y disminución de la fertilidad y capacidad reproductiva tanto de hembras como de machos (Godfroid *et al.*, 2011; Paolicchi *et al.*, 2011).

En la actualidad, la epididimitis en carneros es un padecimiento de amplia diseminación y, se estima que la fertilidad de los carneros infectados por *B. ovis* de manera natural puede disminuir en un 20.0%. Sin embargo, en raras ocasiones puede causar aborto en hembras gestantes en el último tercio de la gestación. Por ello, se le considera como una enfermedad que transita de lo subclínico a lo crónico (Robles, 1998; Praud *et al.*, 2012). Esta información es de vital importancia, puesto que México, es el trigésimo cuarto productor mundial de carne de ovino. Sin embargo, en el 2018 y 2019, para satisfacer la demanda nacional, el país requirió importar 6,734 ton de este tipo de carne, en dicho periodo; siendo los principales proveedores Australia y Nueva Zelanda (SIAP, 2020).

Este déficit productivo de la ovinocultura nacional muestra una ventana de oportunidad para los productores de ovinos en el país; puesto que, el comportamiento histórico de la producción nacional de carne de ovina muestra una actividad ascendente durante el periodo del 2010 al 2019 (Grafica 1) y, cuyo crecimiento anual se estima (β_1 ; .909 mil ton; $p < 0.05$) en casi mil ton/año (SIAP, 2020). De aquí, que el objetivo de la presente investigación fue: evaluar de lesiones histopatológicas del aparato reproductor de los carneros infectados experimentalmente con *Brucella ovis*.

Para el logro del objetivo de esta investigación se requirió de 18 carneros, con los cuales se formaron tres grupos; cada grupo compuesto por seis animales en etapa reproductiva. Dos de los grupos (Grupo 1 y Grupo 2) fueron sometidos experimentalmente a la infección de *B. ovis*, cepa 01Zac-INIFAP; el primer grupo fue inoculado (0.5 ml de inóculo/mucosa a una concentración de 3.9×10^9 UFC) vía mucosas

(conjuntival y prepucial) con dicha cepa; mientras que, en el segundo grupo, la vía de inoculación (1.0 ml de inóculo a una concentración de 3.9×10^9 UFC) fue endovenosa. El tercer grupo (G3) fungió como grupo control, en donde a cada carnero se le administró vía conjuntival y prepucial 0.5 ml de solución salina de fosfato al 0.9% (S:S).

Verificada la infección por el método de serología, todos los carneros de los tres grupos fueron sacrificados a los 189 días post-inoculación y de cada cordero se extrajeron los testículos, cola, cabeza y cuerpo del epidídimo, vesícula seminal, ámpulas, conducto deferente, glándulas bulbo uretrales y la uretra pélvica incluida la próstata diseminada, se obtuvieron muestras de estos tejidos y se enviaron en cubos de parafina histológica para su análisis y clasificación (Sánchez, 2018) de acuerdo con el diseño experimental. Las muestras fueron fijadas y deshidratadas con la técnica de parafina; finalmente se cortaron a cinco micras de grosor y posteriormente se tiñeron con Hematoxilina y Eosina, Tinción de Gram y Tinción de Ácido Alcohol Resistente (BAAR), métodos útiles en la descripción de la lesión e identificación del patógeno.

Los resultados histopatológicos de las muestras pertenecientes a los corderos de los grupos infectados experimentalmente con *B. ovis* mostraron lesiones en dichos órganos; pero, el órgano más afectado fue el epidídimo, las lesiones con mayor abundancia fueron unilaterales, otros órganos comprendidos son las uretras pélvicas y en menor grado fue afectada tanto la vesícula seminal como ámpula. Las lesiones incluyen cúmulos de células inflamatorias, incluso se encontró la formación de granulomas dentro del epidídimo formados a partir de la extravasación los espermatozoides y células inflamatorias.

Cuantitativamente, se encontró que, en los corderos inoculados vía mucosas, la cabeza del epidídimo (derecho) fue la más afectada (83.33% de los carneros analizados); las colas de los epidídimos tanto izquierdo como en el derecho, las lesiones fueron de leve a moderado en un 66.66 %. Pero, las lesiones histopatológicas permitieron establecer que estas fueron predominantemente del tipo hiperplasia (epitelial), atrofia de los estereocilios y formación de vesículas intraepiteliales e infiltraciones de linfocitos.

Ello, en comparación con la degeneración testicular de forma leve a grave encontrada en el grupo de animales inoculados vía endovenosa.

Por lo general, en la literatura se establece que la epididimitis producto de la infección por *B. ovis*, debido a las lesiones causadas en el aparato reproductores del carnero causa epididimitis, subfertilidad e infertilidad en los machos de esta especie (Carvalho *et al.*, 2012; Antunes *et al.*, 2013). Estas lesiones subclínicas o crónicas se restringen por lo general al epidídimo. Pero eventualmente las lesiones se encuentran en testículos y glándulas asociadas al aparato reproductor (Costa *et al.*, 2012).

En concordancia con los establecido con la literatura, sobre las lesiones de *B. ovis*, en carneros infectados naturalmente, en esta investigación se encontró que la cola del epidídimo (derecho) la lesiones fueron clasificadas de leves a moderadas en un 50%. Pero en la cola del epidídimo (izquierdo), las lesiones fueron de leves y moderadas a severas. En el extremo de las lesiones observadas en carneros infectados experimentalmente con esta bacteria se encontró lesiones más severas: formación de granulomas intraepiteliales espermáticos a nivel del tejido intersticial, con infiltración de linfocitos, células plasmáticas, macrófagos y fibras colágena en un proceso de inflamación granulomatosa.

Los hallazgos histopatológicos encontrados en esta investigación, en torno a los efectos de *B. ovis*, concuerdan con otras investigaciones, en las cuales se sugiere que más del 50% de los carneros infectados naturalmente muestran lesiones en el epidídimo. Aspecto que explicaría la reducción en la calidad espermática, motilidad, concentración y morfología del esperma y los efectos detrimentales en la fertilidad de los rebaños afectados por esta enfermedad (Cox *et al.*, 1977; Carvalho *et al.*, 2012).

1. ANTECEDENTES.

1.1. Descubrimiento e historia del género *Brucella*.

En 1887 en la isla de Malta David Bruce descubrió y cultivó el primer miembro del género *Brucella*, a partir del caso presente de fiebre de Malta dentro de la isla ya que su propósito en este lugar era investigar la causa de un padecimiento febril que producía la muerte de los soldados. Más tarde se le dio el nombre de *Micrococcus melitensis*. En 1896 Bernhard Lauritz F. Bang en Dinamarca, descubrió *B. abortus* en vacas abortadas y demostró que era la causa de la enfermedad de Bang, brucelosis bovina o aborto epizootico del ganado bovino (Tans y Davis, 2011).

En 1905 Themistokles Zammit documentó la importancia de las cabras aparentemente sanas ya que estas podrían ser portadoras de *Brucella* que para ese entonces se conocía como fiebre de Malta o mediterránea por lo que se dedujo que el consumo de sus productos era la causa de contagio y forma de adquirir la enfermedad por el consumo de leche infectada. En 1914 Jacob Traum aisló de los fetos abortados de cerdos el microorganismo *B. suis*.

Evans en 1920 comprobó la semejanza de los microorganismos aislados por Bruce, Bang y Traum, llegando a la conclusión de que los microorganismos eran parecidos y que debían provocar enfermedades similares y sugirió utilizar el nombre de *Brucella*, en honor a David Bruce; por su parte Laval en el 2006, afirma que fue Meyer y Shaw quienes propusieron englobar ambos microorganismos (*Micrococcus melitensis* de Bruce y *abortus bacillus* de Bang), con el término común de *Brucella*. En este sentido, las investigaciones han evidenciado las estrechas relaciones morfológicas y serológicas existentes entre ambos microorganismos. No obstante, se ha demostrado que la relación de absorción de aglutininas permite, hasta cierto punto, la diferenciación.

En el año de 1952 se aisló una nueva especie por McFarlán y Colaboradores en Nueva Zelandia, que se denominó *Brucella ovis*, en 1953 a partir de un proceso patológico denominado epididimitis contagiosa del carnero reportada simultáneamente por Simmons y Hall en Australia y por Buddle y Boyes en Nueva Zelandia. En 1956 es reportada por primera vez en América (Robles, 1998). En 1957 Stoenner y Lackman aislaron una quinta especie de este género en ratas del desierto, *Neotomae lepidae*, en el oeste de los Estados Unidos, que se denominó *Brucella neotomea*. Esta última fue aceptada como especie, pero *Brucella ovis* debió de esperar 18 años para ser reconocida (López, 2007). Por lo que, actualmente se reconoce que, la Brucelosis es un padecimiento infeccioso causado por bacterias del género *Brucella*, de las cuales se han descrito: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. ceti*, *B. microti* y *B. neotomae* (Acha, 2001).

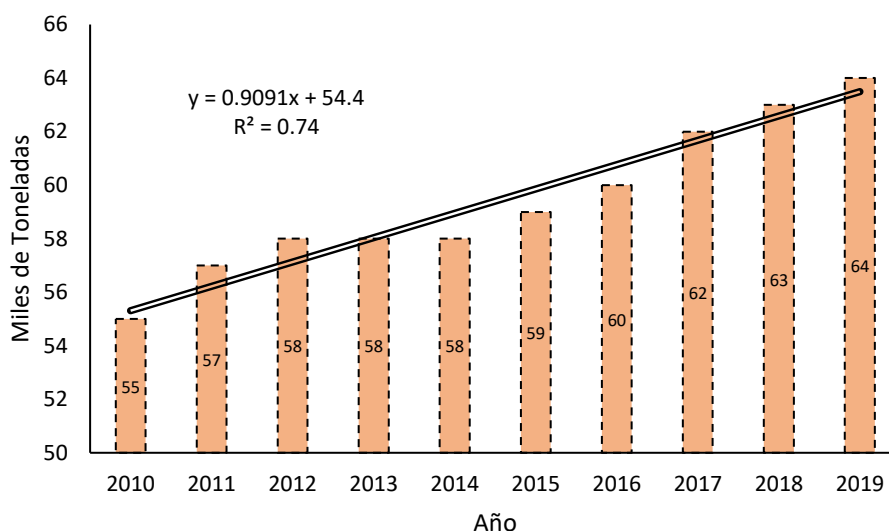
En México las primeras descripciones sobre brucelosis se realizaron en 1905 y 1906 por Valenzuela y Carbajal. En 1921, Vergara describió casos de brucelosis en la ciudad de Puebla (Vega-López *et al.*, 2008). Pero no fue hasta 1923, cuando se aisló e identificó *B. melitensis* por primera vez en humanos (cinco casos) en el país. Estos casos en humanos, constató la existencia de brucelosis en México (Hernández, 2002). En 1924 y 1935 se reportaron los primeros casos en el Distrito Federal y en el Estado de Jalisco, respectivamente (Padrón *et al.*, 2014).

1.2. Producción de ovinos y su relación con *Brucella ovis* en México.

México es el trigésimo cuarto productor mundial de carne de ovino. Sin embargo, en el 2018 y 2019, para satisfacer la demanda nacional requirió importar 6,734 ton de este tipo de carne, en dicho periodo; siendo los principales proveedores Australia y Nueva Zelanda (SIAP, 2020). Este déficit productivo muestra una ventana de oportunidad para los productores de ovinos en el país; puesto que, el comportamiento histórico de la producción nacional de carne de ovino muestra una actividad ascendente durante el periodo del 2010 al 2019 (Grafica 1), cuyo crecimiento anual se estima (β_1 ; .909 mil ton; $p < 0.05$) en casi mil toneladas al año (SIAP, 2020).

La mayor parte de la carne de ovino, en México, se obtiene de rebaños cuyo genotipo es en esencia híbrida; puesto que, solo una pequeña proporción de los rebaños nacionales están constituidos genéticamente por razas de las denominada de pelo (Katadyn, Dorper y Pelibuey) sin descartar razas productoras de lana (Debouillet, Merino australiano y Lincoln) (SADER, 2017). A pesar de estas limitaciones de la ovinocultura del país (potencial genético pobre de los rebaños), en los últimos 10 años la producción promedio ha sido de 59 mil toneladas (ton) en canal (Grafica 1); siendo en barbacoa la principal forma de consumo de carne de ovino en México.

De acuerdo con los censos ganaderos del país, las diez principales entidades productoras de carne (por toneladas) de ovino son: México (centro) con 9,289; Hidalgo (centro), 6,770; Veracruz, 5,425; Jalisco 4,536; Puebla, 4,401; Zacatecas, 4,279; Tlaxcala, 2,870; San Luis Potosí, 2,827; Oaxaca, 2,426; Guanajuato, 2,256 y el resto del país, 18,951; cifras que suman 64,031 toneladas (ton) (SIAP, 2020). Al respecto, en 2019, el estado de México e Hidalgo destacaron en productividad ovina (en canal) con la cuarta parte de la producción nacional (64 mil ton) (SIAP, 2020).



Grafica 1. Comportamiento de la producción de carne de ovino a nivel nacional de acuerdo con el periodo 2010 -2019.

Fuente: SIAP, 2020

Para el caso del estado de Michoacán, se estableció en el 2018 que este posee 5,777 unidades de producción (UP); en el 2019, se incrementaron a 6,476 UP (699 UP más respecto a 2018). Cifra que indica un crecimiento anual del 12.1% en UP dentro del estado en un periodo relativamente corto y el cual, se continúa a moviéndose (Padrón Ganadero Nacional, 2018). De acuerdo con estas cifras del Michoacán y a nivel nacional, en lo que corresponde a producción y consumo de carne de ovino, se explicaría la importancia de tomar con seriedad la afectación por *B. ovis*, puesto que esta es una bacteria que lesiona directamente el aparato reproductor de los carneros machos y probable que sea un factor que limite la producción de carne de ovino en el país y provoque las importaciones de este tipo de producto. Además, no se cuentan con cifras exactas sobre la incidencia o prevalencia de *B. ovis* en el país.

1.3. Características del género *Brucella ovis*.

De acuerdo con la clasificación de las diferentes especies de *Brucella*, esta se clasifica como lisas (S) o rugosas (R). El aspecto que adquieren estas bacterias (S o R) se debe a la expresión del lipopolisacárido (LPS) en la superficie bacteriana; así, las lisas expresan LPS-S, mientras que las rugosas expresan LPS-R. Sin embargo, durante su crecimiento, en medios de cultivo, pueden experimentar mutaciones que modifican la expresión de LPS. Para el caso de *B. ovis* está se clasifica como rugosa (Castro *et al.*, 2005). Pero, se debe aclarar que las cepas de *Brucella* lisas son más virulentas y su ultraestructura se asemeja a la de algunas Enterobacterias (*Yersinia enterocolitica*, *Salmonella landau*, *Pseudomonas maltophilia* y *Escherichia coli*), aunque presenta diferencias en las características de su membrana externa (Figura 1) (Castro *et al.*, 2005).

En 2005, se consideraron diez especies de *Brucella*, ello de acuerdo con sus características antigénicas y su hospedador: *B. abortus*, *B. canis*, *B. ceti*, *B. melitensis*, *B. microti*, *B. neotomae*, *B. ovis*, *B. apinnipedialis*, *B. suis* y *B. inopinata* (*B. inopinata*). Las especies de *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* y *B. canis* son importantes para la salud pública, ya que pueden infectar al ser humano (Figura 1) (Álvarez y Hernández, 2015).

Brucella ovis, es un cocobacilo Gram negativo de 0'3 μ de anchura y 0'7-1'5 μ de longitud y pueden observarse en el microscopio de forma aislada, en pares y/o en racimos; es inmóvil sin capsula y no forma esporas; crece en agar sangre con el 10 % de CO₂; se incuban a una temperatura 37 ° C hasta por 7 días; producen colinas pequeñas circulares, convexas, enteras, relucientes, lisas, translucidas y grises de 0'2-0'4 mm de diámetro, no producen hemólisis (Merchant y Parker, 1975; Pérez *et al.*, 1987).

<i>E-specie</i>	<i>Hospedador</i>	<i>Biovariedad</i>	<i>Producción de H₂S</i>	<i>Necesidad de CO₂</i>	<i>Sensibilidad a los colorantes</i>		<i>Aglutinación con sueros monoespecíficos</i>		
					<i>Tionina</i>	<i>Fucsina</i>	<i>A</i>	<i>M</i>	<i>R</i>
<i>B. melitensis</i>	Cabras, bovinos, ovino, cánidos, hombre	1	-	-	+	+	-	+	-
		2	-	-	+	+	+	-	-
		3	-	-	+	+	+	+	-
<i>B. abortus</i>	Bovinos, cánidos, hombre	1	+	+	-	+	+	-	-
		2	+	+	-	-	+	-	-
		3	+	+	-	+	-	+	-
		4	+	+	-	+	-	+	-
		5	-	-	+	+	-	+	-
		6	-	-	+	+	+	-	-
		7	+	-	+	+	+	+	-
		8	-	+	+	+	+	+	-
		9	+	+	+	+	-	+	-
<i>B. suis</i>	Cerdos, cánidos, hombre	1	-	-	+	-	+	-	-
		2	-	-	+	-	+	-	-
		3	-	-	+	+	+	-	-
		4	-	-	+	-	+	+	-
		5	-	-	+	-	-	+	-
<i>B. canis</i>	Cánidos, hombre	-	-	+	-	-	-	+	
<i>B. neotomae</i>	Rododros	+	-	-	-	+	-	-	
<i>B. ovis</i>	Ovinos	-	+	+	-	-	-	+	
<i>B. maris</i>	Focas, leones marinos, delfines, ballenas.	-	-	-	-	-	-	-	

Figura 1. Especies que integran el género *Brucella*, hospedadores conocidos y características bioquímicas y antigénicas que permiten clasificarlas en biovariedades. A y M: configuraciones alternativas del PSO, R: LPS de las cepas rugosas.

Fuente: Castro *et al.*, 2005.

1.4. Estructura y composición química.

1.4.1. Estructura externa.

La membrana externa de la *Brucella* es rica en fosfatidilcolina a diferencia de la perteneciente a las enterobacterias relacionadas con ella, en las cuales su membrana es rica en fosfatidiletanolamina. El componente más abundante y mejor estudiado en las cepas de *Brucella* es el LPS (Figura 2), al cual se le denomina también como endotoxina (Castro et al., 2005).

En el LPS se distinguen tres regiones: el lípido A, inserto en la hoja externa de la membrana, un oligosacárido interno, llamado núcleo, y el polisacárido O (PSO), también conocido como cadena O, ausente o presente con pocos residuos en el LPS-R. La forma lisa está constituida por el lípido A, el núcleo y el polisacárido O (PSO). El LPS-R de las formas rugosas carece de cadena (Figura 2) (Castro et al., 2005).

El lípido A es un glicolípido que contiene glucosamina y diaminoglucosa. En sus grupos amino e hidroxilos presenta sustituciones por ácidos grasos de variada longitud de cadena. El núcleo contiene glucosa, manosa y ácido 3, deoxi-D-mano 2 octulosónico (KDO) y no contiene heptosas ni fosfatos. La quinovosamina está presente en el núcleo del LPS, pero no en el de LPS- R. El PSO es la porción más distal del LPS. Es un homopolímero lineal compuesto por n-residuos, puede ser de dos tipos de N-formil perosamina (4,6 dideoxi-4-formamido- α -D-manopiranosilo). La unión entre estos residuos puede ser de dos tipos: α 1-2 o α 1-3, lo que permite diferenciar dos configuraciones alternativas, la A y la M, de mucha importancia en la determinación de la biovariedades, que se establecen a partir de alternancia de las uniones entre residuos en el PSO (Figura 2) (Castro et al., 2005).

Las *Brucellas* contienen otro polisacárido denominado hapteno nativo (HN). Que es químicamente idéntico, a la cadena O, pero no está unido al núcleo. Se ha descrito un tercer polisacárido conocido como poli B, que se obtiene a partir de sepa mutante en fase rugosa *B. melitensis* 115, por tratamiento con ácido tricloroacético 0,2 M y que para algunos autores sería químicamente equivalente al HN. Las proteínas de la membrana

externa (PME u OMPs) se asocian estrechamente con los LPS. Dentro de éstas se encuentran las denominadas proteínas mayores, que se clasifican en tres grupos de acuerdo con sus pesos moleculares: grupo 1 (89-94-kDa), grupo 2 (36-38 kDa) y grupo 3 (25-27 y 31-34 kDa) y se encuentran expuestas en la membrana externa, pero son menos accesibles en las cepas lisas que en las rugosas, debido al impedimento estérico ocasionado por las cadenas O de LPS de las primeras. Mediante el empleo de los

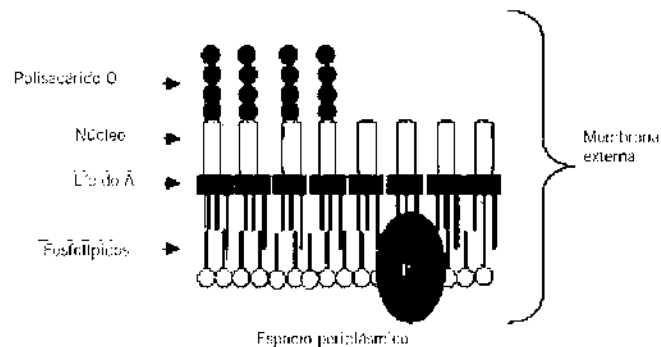


Figura 2. Membrana externa (LPS-S) de la pared celular de *Brucella*.

Fuente: Castro *et al.*, 2005.

anticuerpos monoclonales se han identificado otras proteínas de membrana menos abundantes que se denominan proteínas menores, siendo algunas lipoproteínas (Castro *et al.*, 2005).

1.4.2. Estructura interna.

Las proteínas citoplasmáticas de las bacterias, del género *Brucella* son específicas de este género y la mayoría son compartidas por todas las especies. Algunas de estas proteínas son de interés diagnóstico, como por ejemplo la glicoproteína (A2) termorresistente, una proteína de (17 kDa), involucrada en la síntesis de riboflavina, que aparece en la fase activa de la infección y la proteína periplásmica BP26. Todas estas proteínas forman parte del antígeno denominado CP, empleado en pruebas del ensayo inmunológico eritrol alcohol de 4 átomos de carbono, factor de crecimiento para *Brucella* (pruebas de ELISA) (Castro *et al.*, 2005).

1.5. Propiedades bioquímicas.

Es incapaz de fermentar los azúcares. No utiliza la glucosa ni licua la gelatina, pero oxida la citrulina, arginina y prolina. Utiliza la serina y el ácido D-aspártico, es ureasa negativa, no forma ácido sulfhídrico (H₂S), no reduce los nitratos, no altera la leche tornasolada, Son negativas al indol, rojo de metilo, Voges- Proskauer y amoníaco, son catalasa positiva (Merchant y Parker, 1975).

1.6. Etiología de la epididimitis infecciosa de los carneros.

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 en 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 nasales (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) (Bulgin y Anderson, 1983).

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). Mientras que, *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 de 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 (Hughes, 1972; Paolicci *et al.*, 2013).

1.7. Identificación del agente etiológico.

En los ovinos, la bacteria causante del proceso infeccioso es la *Brucella ovis*, de la cual se han documentado algunas de sus características y la patogenicidad tanto en carneros como en ovejas (Biberstein *et al.*, 1964; Hughes, 1972; Brown *et al.*, 1973). En general, la brucelosis produce problemas que afectan el proceso reproductivo, a través de afectar la fertilidad en machos y en el caso de las hembras por causar abortos. La brucelosis es una enfermedad infecciosa cuya prevalencia es considerada del 2 al 40 % (Radostitis *et al.*, 1994). No se han comprobado casos en humanos por *B. ovis* (Acha y Szyfres, 2001).

Para la obtención de muestras y aislamiento del agente etiológico causante de la brucelosis en ovinos se realizan varias técnicas, una de las más valiosa para el aislamiento de la *B. ovis* es en animales vivos a partir del semen, los hisopos vaginales y la leche. El esperma (líquidos genitales) se pueden obtener fácilmente con hisopos tomados de la cavidad prepucial después de la electroeyaculación. Dichos hisopos también se pueden tomar directamente de la vagina de ovejas libres de *brucelosis inmediateamente* después de la monta natural por un carnero que se sospecha de la infección. Los carneros infectados presenten o no signos clínicos, pueden excretar la *B. ovis* de forma intermitente con el esperma durante años. Los hisopos vaginales que se toman después de un aborto o parto prematuro y las muestras de leche son muestras muy recomendables para aislar *B. ovis* de ovejas infectadas (López *et al.*, 2017; Sánchez *et al.*, 2018).

Para el aislamiento de *B. ovis* después de la necropsia, los órganos preferidos en cuanto a la probabilidad de aislamiento son el epidídimo, vesícula seminal, las ámpulas de los conductos deferentes y los ganglios linfáticos inguinales de los carneros y los ganglios linfáticos ilíacos y supra mamarios en las ovejas. Sin embargo, para obtener la sensibilidad máxima, se debe de realizar una búsqueda completa que incluya otros órganos y ganglios linfáticos (esplénicos, craneales, escapulares pre femorales, y testiculares. También se pueden examinar los corderos muertos y las placentas. Los sitios preferidos para el aislamiento a partir de los corderos abortados o nacidos muertos son el contenido del abomaso y el pulmón (López *et al.*, 2017; Sánchez *et al.*, 2018).

El microorganismo permanece viable durante 48 a 72 horas a temperatura ambiente, pero si el cultivo va a retrasarse la supervivencia mejora refrigerándolo o preferiblemente congelando muestras tisulares. La *B. ovis* puede ser aislada de medios no selectivos como el agar sangre base enriquecido con suero de ovino o bovino estéril, al 10% o en medio de agar sangre con un 5-10% de sangre ovina estéril (OIE, 2018).

1.8. Epidemiología.

Si bien como ya se mencionó, la transmisión venérea es la principal vía de contagio en machos con experiencia sexual (Bulgin y Anderson, 1990; Radostits *et al.*, 1994), el contagio de carneros vírgenes se produce frecuentemente durante los períodos de estabulación prolongada y durante el cual 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, 1990). Asimismo, la conducta homosexual de los machos fuera de la época de servicio favorecería la entrada del microorganismo a través de la mucosa rectal (sodomía) (Bulgin y Anderson, 1990).

El carnero infectado con *B. ovis* constituye el principal reservorio en el rebaño, siendo el semen fundamental en la difusión de la enfermedad. La liberación de *B. ovis* en semen es intermitente y por períodos prolongados, habiéndose hallado cultivos positivos hasta 80 semanas post-infección experimental (Paolicchi *et al.*, 1991; Praud *et al.*, 2012).

Si bien *B. ovis* no afecta la concepción, puede provocar mortalidad embrionaria con infertilidad transitoria y en menor proporción en hembras, abortos hacia el final la gestación (González *et al.*, 1994), así como placentitis, con lo que se impide la nutrición fetal y ocasiona abortos o el nacimiento de corderos prematuros o débiles. Si no se presta adecuada asistencia en el momento del parto, el cordero infectado muere; si sobrevive éste puede ser un potencial portador pudiendo desarrollar la enfermedad al llegar a la pubertad y madurez sexual (Buddle, 1983).

Aunque la oveja se recupera de la infección luego del parto, se ha comprobado que ésta, excreta *Brucella ovis* a través de las secreciones vaginales y uterinas, placenta y loquios. Así mismo, si bien la leche puede ser una potencial fuente de infección, no existe información de la transmisión por esta vía al cordero lactante (Hughes, 1972). Sin embargo, podría ser un elemento importante para la persistencia de la enfermedad dentro del rebaño, dado que los desechos vaginales infecciosos podrían entrar en contacto con carneros susceptible (Hughes, 1972).

1.9. Transmisión y patogenia.

La causa de la enfermedad se encuentra presente en el semen de los animales enfermos, y se transmite a los animales susceptibles una vez que la *Brucella* entra en contacto con las membranas mucosas, ocurre durante el contacto homosexual, y coito heterosexual (Kimberling, 1987, citado por Sánchez, 2018).

Durante la estación no reproductiva a menudo los carneros conviven con animales de diferentes edades, así es común que durante los contactos sea depositado el semen en la mucosa rectal y en la zona perineal incluyendo la piel y lana de la misma

zona de los animales montados, otros animales pueden montar al mismo animal y ello permite el contagio; así mismo es común que durante el período reproductivo uno o varios carneros monten a una misma hembra y en ella sea depositado semen de cada uno de ellos, y al mismo tiempo entren en contacto con el semen de otros animales (Kimberling, 1987; citado por Sánchez, 2018).

Una vez que la bacteria entra en contacto con la mucosa, el germen penetra en el tejido del huésped y llega a los nódulos linfoides regionales a través de la vía linfática aferente. Posteriormente causa una hiperplasia de células retículo endoteliales, algunos organismos pasan a través de los nódulos, entran a sangre y se difunden a otros órganos, hasta localizarse en epidídimos, vesículas seminales, glándulas bulbos uretrales, y ámpulas (Kimberling, 1987; citado por Sánchez, 2018).

De 21 a 45 días después de la exposición original, el epidídimo puede desarrollar lesiones macroscópicas, y aproximadamente a los 60 días, la infección se ha diseminado a nódulos linfáticos, bazo e hígado. Al localizarse en el epidídimo, se inician cambios alrededor del sitio afectado, los fluidos se comienzan a acumular en el tejido intersticial y las células linfoides y células plasmáticas se congregan en los vasos sanguíneos, especialmente los neutrófilos migran al interior del conducto epididimal, posteriormente las células experimentan hiperplasia creando pliegues que obstruyen el lumen y desarrollan quistes murales (Kimberling, 1987; citado por Sánchez, 2018).

Posteriormente las masas de espermatozoides se acumulan proximales a la oclusión y se extravasan dentro del tejido intersticial. Los segmentos de los conductos repletos de espermatozoides provocan reacciones inflamatorias que se transforman en granulomas. Seguido a la obstrucción completa de los conductos epididimarios, los túbulos seminíferos degeneran y los testículos se atrofian. Desafortunadamente las lesiones macro se presentan más comúnmente en las glándulas vesiculares que en el epidídimo; por otro lado, se han reportado porcentajes de hasta el 14% de animales que desarrollan las lesiones macroscópicas (Kimberling, 1987; citado por Sánchez, 2018).

La calidad del semen puede variar en cuanto al número de espermatozoides, leucocitos y bacterias, motilidad y deformidades independientemente de las lesiones macroscópicas mencionadas con anterioridad. Posterior a la infección se desarrolla una respuesta serológica; al disminuir la bacteriemia (aproximadamente a los dos meses), y los anticuerpos séricos pueden aparecer dos semanas después y persistir por meses o años (Kimberling, 1987; citado por Sánchez, 2018).

1.10. Lesiones macroscópicas.

En estados avanzados el epidídimo infectado puede estar considerablemente aumentado de tamaño y con induración. Al cortar la superficie pueden encontrarse granulomas de células espermáticas con contenido de cremoso a rojo, pueden aparecer también fibrosis y abscesos con focos mineralizados. Los testículos pueden aparecer suaves y atróficos (Kimberling, 1987; Radostits *et al*, 1994).

A la necropsia pueden encontrarse lesiones limitadas al aparato reproductor (Carvalho *et al.*, 2011), 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; como se citó en Sánchez, 2018).

1.11. Lesiones microscópicas.

Los tejidos intersticiales afectados presentan fibroplasia y es frecuente encontrar granulomas de células espermáticas. Los conductos del epidídimo pueden estar dilatados y parcialmente llenos de espermátides y leucocitos. 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 afectada presentando colapso en el lumen (Carvalho *et al.*, 2011; Kimberling, 1987).

Existe una variedad de cambios en la pared y epitelio de la ámpula y conducto deferente. Normalmente se encuentran áreas focales de necrosis. Los neutrófilos están 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. Esas células se presentan en el lumen de las dilataciones saculares formadas por el epitelio (Carvalho *et al.*, 2011; Kimberling, 1987). Los cambios en el epitelio varían desde hiperplasia a pínosis y carríolisis (Kimberling, 1987).

1.12. Diagnóstico clínico.

El diagnóstico de la epididimitis contagiosa del carnero se basa en la combinación del examen clínico y su confirmación mediante el aislamiento de *B. ovis* en el semen y/o resultados positivos en las pruebas serológicas (Alton *et al.*, 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 siendo portadores y transmisores de la enfermedad, sin embargo, el hallazgo de un animal con epididimitis es solo orientativo y se debe realizar el diagnóstico diferencial (Estein, 1999; West, 2002).

1.13. Diagnóstico de laboratorio.

La prueba de ELISA supera en sensibilidad y especificidad a algunas técnicas y permite el procesamiento de gran número de muestras simultáneamente, además la hemólisis o las acciones vs el complemento del suero no afectan la reacción de la prueba de ELISA. Por otro lado, 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 se han obtenido por la combinación de la inmunodifusión doble en gel (IDGGA) y ELISA, resultando en una sensibilidad del 100% (Estein, 1999).

Otra de las pruebas de laboratorio que se puede desarrollar para su diagnóstico es Fijación de Complemento, con buena sensibilidad, sin embargo, este si puede afectarse por hemolisis del suero (Hungerford, 1975).

1.14. Signología.

Posterior al proceso de incubación (dos a ocho semanas), las primeras lesiones son detectables, en casos agudos puede notarse un leve crecimiento e induración del epidídimo sin involucrar cambios en testículos, puede existir dolor, adema e inflamación del escroto y engrosamiento de su contenido (Radostits *et al.*, 1994). Puede haber una reacción sistémica caracterizada por fiebre, depresión e incremento del gasto respiratorio acompañado de signos localizados en aparato reproductor (Radostits *et al.*, 1994; Hungerford, 1975).

Conforme avanza la infección el agrandamiento se vuelve fibrótico y el testículo pierde consistencia y se atrofia. Algunos casos agudos pueden remitir y no presentar lesiones mayores. Aunque las lesiones son principalmente en la cola del epidídimo, se pueden ver afectados cuerpo y cola del mismo órgano. De existir abscesos pueden ser fluctuantes a la presión digital. Los carneros afectados pueden presentar libido normal y la calidad seminal es extremadamente variable; el semen puede tener menor cuenta espermática, presencia de leucocitos, decremento de motilidad espermática, incremento de espermatozoides decapitados y una variación del número de *B. ovis* (Kimberling, 1987; Radostits *et al.*, 1994).

1.15. Diagnóstico diferencial.

El diagnóstico diferencial de la epididimitis causada por *B. ovis*, requiere considerar epidídimo-orquitis (epididimitis de los corderos) (Estein, 1999), abscesos y mineralización testicular y varicocele. Algunas de esas enfermedades son indistinguibles clínicamente, sin embargo, la prueba de ELISA puede diferenciar los casos de epididimitis causada por *B. ovis* y la epidídimo-orquitis; por otro lado, los cultivos pueden servir para identificar específicamente la causa bacteriana (Kimberling, 1987; Hungerford, 1975).

Los abscesos causados por *Corynebacterium ovis* pueden ocurrir en cualquier parte del testículo, epidídimo y túnica vaginal, dichas lesiones pueden ser grandes, pueden fluctuar a la palpación y puede haber 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 el epidídimo orquitis, causado por *Actinobacillus seminis*. La mineralización testicular es generalmente unilateral, en estados avanzados el testículo es duro como piedra, pero puede ser de tamaño normal, mientras que el epidídimo puede estar de tamaño normal. Por otro lado, el varicocele de la vena interna espermática es una masa nodular firme en el cordón espermático proximal al plexo pampiniforme (Kimberling, 1987).

1.16. Prevención y control.

El objetivo primario en los programas de control está dirigido a que no se difunda la infección entre los carneros (Radostits *et al.*, 1994). 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. 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 el período de baja actividad sexual 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 reactores positivos, así como los animales que presenten lesiones macroscópicas.

Se deberán transferir a los animales negativos a 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 (Kimberling, 1987).

3.- Kimberling (1987). Sugiere la vacunación de los animales a los 4-5 meses de edad con *B. mellitensis*, sin embargo, se tiene el inconveniente de interferir con los títulos de las pruebas serológicas; la vacunación con *B. ovis* no confiere buena protección además de interferir con las pruebas serológicas contra *B. melitensis* por lo que en México no está recomendada para el control de la Brucelosis (NOM-041-ZOO-1995).

4.- Al adquirir animales nuevos en el rebaño libre, previamente deberán tener dos pruebas negativas de ELISA (Kimberling, 1987).

De acuerdo con lo anteriormente citado, se puede establecer la importancia (productiva, económica y de salud pública) que tiene esta patología en los ovinos. Por ello, es importante investigar aún más sobre *Brucella ovis* y su efecto en los rebaños del país.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

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), aunado al gasto que representa un tratamiento sin el adecuado diagnóstico en relación con la *B. ovis*. Aun que si bien, se conocen los cambios patológicos producidos por *B. ovis*, aún no se establece totalmente cómo puede afectar la respuesta inmune la presentación de lesiones histopatológicas. Por lo que es importante desarrollar investigaciones encaminadas a conocer más de la patogenia, así como los diferentes métodos de diagnóstico, y los cambios patológicos que pueden desarrollarse en los animales expuestos a *B. ovis*, y hacer un seguimiento de la respuesta inmune de la enfermedad. Por ello, para mejorar el control de esta enfermedad es importante realizar estudios que permitan conocer más acerca de las lesiones histopatológicas que causa la *B. ovis* en los órganos reproductores en machos de carnero; sobre todo, si se considera que las lesiones macro se presentan una vez que la enfermedad tiene un avance crónico, con lo que la información podría usarse para prevenir esta afección infectocontagiosa y obtener alternativas de acción contra la infección de *B. ovis*.

3. JUSTIFICACIÓN.

México es el trigésimo cuarto productor mundial de carne de ovino. Sin embargo, para satisfacer la demanda nacional requiere de importar cantidades grandes (6,734 ton) de este tipo de carne de Australia y Nueva Zelanda, principalmente (SIAP, 2020). Este déficit productivo es una ventana de oportunidad para los productores de ovinos en el país. De acuerdo con las importaciones de carne de ovino en México, se explicaría la importancia de tomar con seriedad la afectación por *Brucella ovis*, puesto que esta es una bacteria que lesiona directamente el aparato reproductor de los carneros machos y probable que sea un factor que limite la producción de carne de ovino y provoque el déficit para cubrir la demanda de este tipo de producto en el país. Por lo que es importante desarrollar estudios que permitan conocer más respecto a esta enfermedad, debido a que, la variabilidad de la prevalencia de la epididimitis por *B. ovis* puede ser de 2 a 40 % en los carneros del rebaño, pero sin la información adecuada, la prevalencia podría superar el 40% (Gutiérrez *et al.*, 2015).

4. HIPÓTESIS.

La inoculación experimental de carneros (vía mucosa o endovenosa) con *Brucella ovis*, permite evaluar y describir con certeza el inicio de las lesiones histopatológicas del aparato reproductor de estos animales, en especial las lesiones de los epidídimos; puesto que se registró el inicio de la inoculación y se confirmó el diagnóstico de la enfermedad dentro del lapso de los 21 días post-inoculación¹. Además, no solo se establecerá (con las tinciones de BAAR y Gram) la morfología microscópica de *B. ovis* sino también, se observarán las bacterias en el sitio de la lesión (epidídimo cabeza/cola).

¹ Evidencias mostradas en la investigación de Sánchez *et al.* (2018); de la cual esta tesis es parte del proyecto mayor: EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE Y LAS ALTERACIONES SEMINALES EN LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON *Brucella ovis*.

5. OBJETIVOS.

5.1. Objetivo general.

Evaluar y describir las lesiones histopatológicas del aparato reproductor (membrana nictitante, ganglio inguinal, vesícula seminal, testículo derecho e izquierdo rete testicular, capsula testicular, glándula bulbo Uretral, epidídimo derecho e izquierdo uretra pélvicatestículos, cola, cabeza, cuerpo y ámpulas) de los carneros infectados experimentalmente con la cepa 01Zac-INIFAP de *B. ovis*.

5.2. Objetivos particulares.

1. Identificar, a través de tinciones de Hematoxilina y Eosina, Gram y BAAR, en los cortes histopatológicos las lesiones que causa la *B. ovis* en: testículos, epidídimo, glándulas bulbos uretrales y próstata diseminada de corderos infectados experimentalmente.
2. Evaluar y describir las lesiones causadas por la inoculación de *B. ovis* en los diferentes tejidos del aparato reproductor de los carneros.
3. Caracterizar las lesiones causadas por la inoculación de *B. ovis* vía mucosa e intravenosa en los diferentes tejidos del aparato reproductor de los carneros.

6. MATERIALES Y METODOS.

La preparación de los cortes histopatológicos y tinciones de Hematoxilina y Eosina, Gram y BAAR, se llevó a cabo en el Área de Histopatología de la Unidad de Servicios Auxiliares para el Diagnostico (USAD), Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), ubicada en el Km 9,5 de la carretera Morelia-Zinapécuaro, municipio de Tarímbaro Michoacán, Localizado al norte del estado en las coordenadas 19°48´ de latitud norte y 101°10´ de longitud oeste, a una altura 1960 msnm (INEGI, 2022), durante los meses de julio y agosto, 2017.

Distribución de los grupos de inoculación: De acuerdo con los tejidos que se recibieron en cubos de parafina histológica se clasificaron en tres grupos (Sánchez, 2018) de acuerdo con el diseño experimental (Tabla 1):

Tabla 1. Diseño experimental de los carneros infectos experimentalmente con *Brucella ovis* (cepa 01Zac-INIFAP) de acuerdo con el grupo y vía de inoculación.

Grupo	Vía de tratamiento	Volumen	Concentración de inóculo
1 (n=6) Mucosa	Instilación conjuntival	0.5 mL	3.9x10 ⁹ CFU/mL
	Instilación prepucial	0.5 mL	
2 (n=6) Endovenoso	Intravenosa	1.0 mL	3.9x10 ⁹ CFU/mL
3 (n=6) Control	Instilación conjuntival	0.5 mL SSF	_____
	Instilación prepucial	0.5 mL SSF	

SSF=Suero salino fisiológico

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 SSF según el grupo usando una jeringa sin aguja y posterior masaje en la abertura prepucial (Sánchez, 2018).

Grado de lesión histopatológica: Se caracterizaron las lesiones presentadas en los tejidos de los órganos del aparato reproductor de los carneros, registrando las lesiones y su ubicación en el testículo y el epidídimo. A las lesiones se les clasificó de la siguiente manera: grado un (*), lesión leve que incluyeran edema y problemas de deslizamiento; grado dos (**), lesión moderada que incluyeran induraciones, grado tres (***), lesión grave que incluyeran adherencias y granulomas, grado cuatro (****), lesión severa, donde se observan los granulomas inter-espermáticos a nivel intersticial, con la infiltración de histiocitos y linfocitos y fibroblastos.

Procesamiento de los cortes del aparato reproductor: De acuerdo con los cubos de parafina histológica que se recibieron del tejido del aparato reproductor del carnero, se procedió a realizar los cortes a 4 μm de espesor, y se tiñeron con Hematoxilina y Eosina, GRAM y BAAR (Carvalho *et al.*, 2011).

Procedimiento de las muestras previo para la elaboración de tinciones: Se realizaron los cortes a 4 μm de espesor, en un micrótopo manual de rotación de la marca (MICROM® modelo HM325). Los cortes obtenidos se pasaron a un baño de flotación para distenderse y posteriormente ser seleccionados para el proceso de tinción. Las muestras teñidas se sometieron a montaje con resina sintética (Entellan®, Merck, No. 1.07961, 500 ml).

Procedimientos de las tinciones: Los tejidos, son incoloros y por ello se requieren teñir para observar sus características morfológicas con el microscopio, lo cual se consigue con el uso de los colorantes que son capaces de unirse de manera específica a estructuras del tejido aportándoles color.

Hematoxilina de Harria-Eosina: En el anexo 10.3., se puede observar el procedimiento de la tinción, para observando en el microscopio núcleos de color azul, citoplasma de color rosado a rojo y los tejidos de color rosado al rojo (Prophet, 1995).

Ácido-Alcohol resistente: En el anexo 10.1., podemos observar el procedimiento de la tinción de BAAR por el método Fite para bacterias ácido alcohol resistente observando en el microscopio, cocobacilos o bacilos ácido alcohol resistentes de color rojos, con fondo azul (Prophet, 1995).

Gram: En el anexo 10.2., se observa el procedimiento de Coloración de Brown y Brenn (Gram), para la observación de bacterias, observando en el microscopio bacterias Gram-positivas de color azul, bacterias Gram negativas de color rojo y otros elementos tisulares de color amarillo (Prophet, 1995).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Las infecciones causadas por *B. ovis* están asociadas a problemas de índole reproductivo; ello, en mayor o menor grado de afección dependiendo de varios factores, entre los que se encuentran el sistema de producción. Por un lado, el proceso puede ocurrir en su forma subclínica y, en consecuencia, la salud y los indicadores reproductiva de los carneros ($\leq 50\%$ de fertilidad) son afectados paulatinamente (por lo general las lesiones se aprecian tardíamente) y con ello, la productividad y rentabilidad de los sistemas de producción. De aquí la importancia de los resultados encontrados en esta investigación, puesto que se pudo establecer con exactitud el inicio de la enfermedad de los carneros analizados, al ser inoculados experimentalmente vía mucosa o endovenosa con *B. ovis* (cepa 01Zac-INIFAP) (Tabla 2).

Tabla 2. Tiempo mínimo para diagnosticar seropositividad y máxima seropositividad en borregos infectados experimentalmente con *B. 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.

Fuente: (Sánchez *et al.*, 2018).

De acuerdo con los resultados, se pudo establecer que los órganos más afectados de los carneros (G1) inoculados vía mucosa (conjuntival y prepucial) con la cepa 01Zac-INIFAP fueron los epidídimos de la cola izquierdo y derecho (Anexos, Tabla 1); en donde los hallazgos histopatológicos mostraron tanto lesiones leves como graves; encontrando edema, deslizamiento, induraciones, adherencias y granulomas; estos últimos (granulomas inter-espermáticos) presentaron, a nivel intersticial, infiltración de histiocitos, linfocitos y fibroblastos.

En cuanto a los órganos más afectados en los carneros analizados, independientemente del tratamiento al cual fueron sometidos (Anexo Tabla 2), fueron los epidídimos, (cabeza, cuerpo y cola) en primer lugar; en segundo lugar, testículos y en menor grado, las glándulas accesorias (ámpula, vesícula seminal, glándula bulbo uretral y próstata además de la uretra), estas lesiones se describen en: grado uno (*), carneros con lesiones leves que incluyeron edema y problemas de deslizamiento, grado dos (**), lesiones que incluyeron induraciones y grado tres (***), casos con lesiones adherencias y granulomas, grado cuatro (****) granulomas intraespermáticos en el tejido intersticial, con infiltración de linfocitos, células plasmáticas e inflamación tipo granulomatosa.

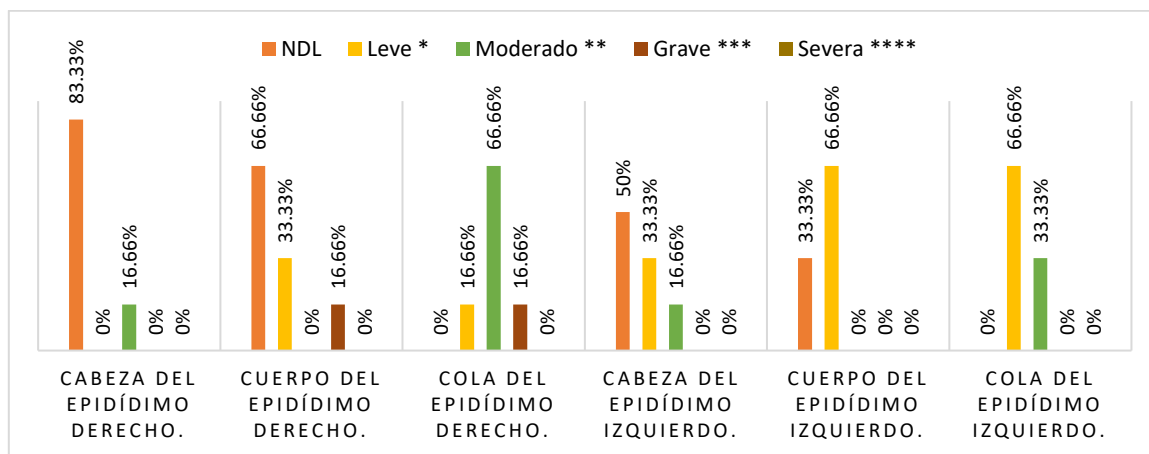
Sin embargo, en carneros inoculados con *B. ovis* (01Zac-INIFAP) vía intravenosa (G2), se observaron lesiones más severas (carnero número 49) vs carneros inoculados vía mucosa y endovenosa en epidídimo (derecho), principalmente en la cabeza y cola. Respecto al epidídimo izquierdo (parte de la cola) se apreciaron lesiones histopatológicas de leves a escasas. Evidencias similares a lo reportado por Cox *et al.*, (1977); aspecto que sugiere mantener en constante vigilancia a los rebaños para realizar diagnósticos tempranos y detectar mayor cantidad de carneros infectados.

Paolicchi *et al.*, (1991), establecieron que los órganos más afectados fueron los epidídimos, aspecto que concuerda con los hallazgos de esta investigación. Sin embargo, estos investigadores no señalan lesiones bilaterales graves con adherencia e induraciones, granulomas en la cola del epidídimo. Aspecto que fue observado en el 100% de los carneros analizados y que fueron infectados experimentalmente con *B. ovis* (cepa 01Zac-INIFAP) por ambas vías (mucosas y endovenosa).

En relación con el grupo control (G3), no se observaron lesiones histopatológicas en los órganos membrana nictitante, ganglio inguinal, vesícula seminal, testículo derecho e izquierdo (rete testicular, capsula testicular), glándula bulbo uretral, epidídimo derecho e izquierdo (cabeza, cuerpo y cola) y uretra pélvica.

Sánchez *et al.*, 2018, establecieron que las lesiones encontradas en carneros diagnosticados con *B. ovis* muestran que esta bacteria muestra predilección por el tejido del aparato reproductivo de estos animales, e incluso, los carneros infectados por *B. ovis* después de 30 días post infección, las lesiones son mayores dentro del aparato reproductivo. Aunado a ello, este patógeno posee capacidad para sobrevivir dentro de los macrófagos. Lo que hace más difícil el control y erradicación de la infección por el propio organismo. Aspecto que le confiere a esta enfermedad la clasificación de infección crónica con afecciones en la fertilidad del carnero y en consecuencia del rebaño mismo.

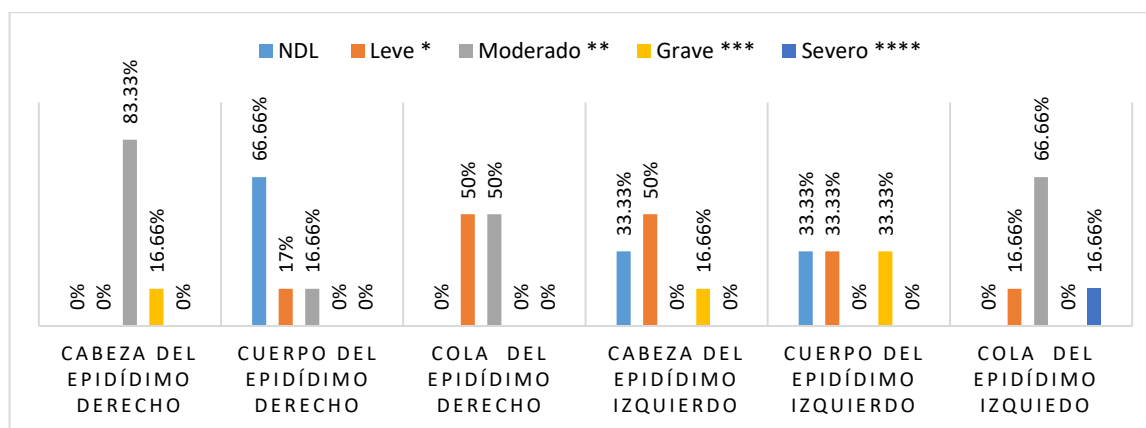
Cuantitativamente, se encontró que, en los corderos inoculados vía mucosas, la cabeza del epidídimo (derecho) fue la más afectada (83.33% de los carneros analizados); las colas de los epidídimos tanto izquierdo como en el derecho, las lesiones fueron de leve a moderado en un 66.66 % (Grafica 2). Pero, las lesiones histopatológicas permitieron establecer que estas fueron predominantemente del tipo hiperplasia (epitelial), atrofia de los estereocilios y formación de vesículas intraepiteliales e infiltraciones de linfocitos.



Grafica 2. Cabeza, cuerpo y cola del epidídimo derecho e izquierdo Inoculación por mucosas.

Por lo general, en la literatura se establece que la epididimitis producto de la infección por *B. ovis*, debido a las lesiones causadas en el aparato reproductor del carnero causa epididimitis, subfertilidad e infertilidad en los machos de esta especie (Carvalho *et al.*, 2012; Antunes *et al.*, 2013). Estas lesiones subclínicas o crónicas se restringen por lo general al epidídimo. Pero eventualmente las lesiones se encuentran en testículos y glándulas asociadas al aparato reproductor (Costa *et al.*, 2012).

En concordancia con lo establecido con la literatura, sobre las lesiones de *B. ovis*, en carneros infectados naturalmente, en esta investigación se encontró que la cola del epidídimo (derecho) la lesiones fueron clasificadas de leves a moderadas en un 50%. Pero en la cola del epidídimo (izquierdo), las lesiones fueron de leves y moderadas a severas (Grafica 3). En el extremo de las lesiones observadas en carneros infectados experimentalmente con esta bacteria se encontró lesiones más severas: formación de granulomas intraepiteliales espermáticos a nivel del tejido intersticial, con infiltración de linfocitos, células plasmáticas, macrófagos y fibras colágena en un proceso de inflamación granulomatosa.

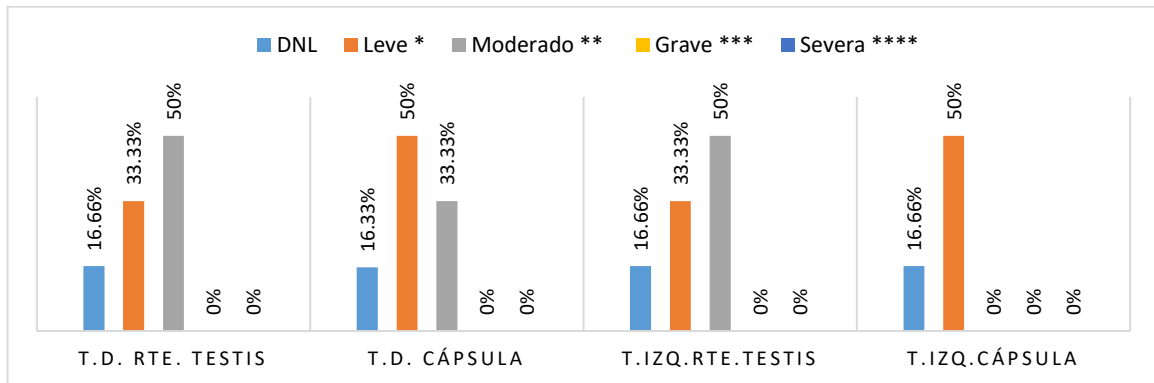
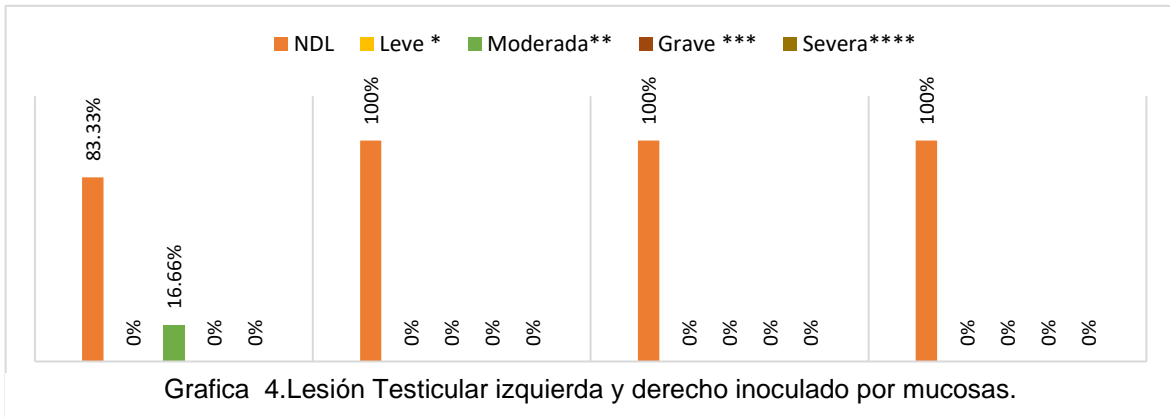


Grafica 3. Cabeza, cuerpo y cola del epidídimo derecho e izquierdo, inoculado por vía endovenosa.

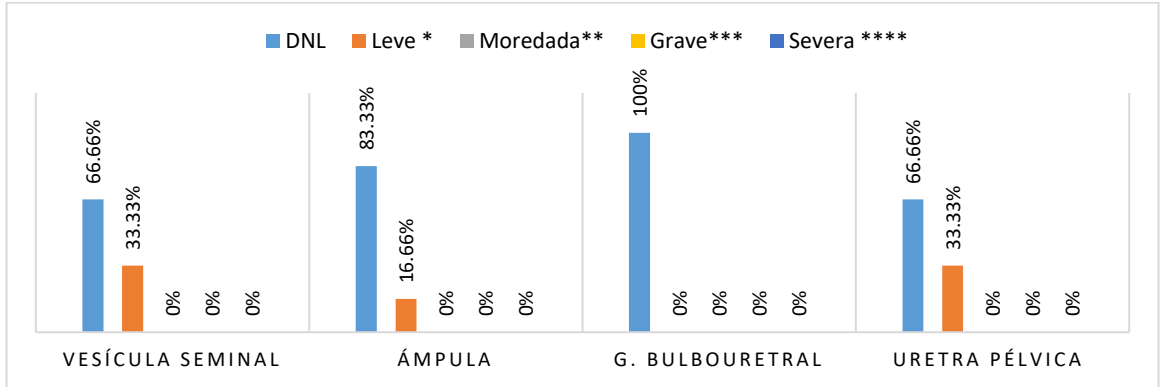
Los hallazgos histopatológicos encontrados en esta investigación, en torno a los efectos de *B. ovis*, concuerdan con otras investigaciones, en las cuales se sugiere que más del 50% de los carneros infectados naturalmente muestran lesiones en el epidídimo. Aspecto que explicaría la reducción en la calidad espermática, motilidad, concentración y morfología del espermatozoide y los efectos detrimentales en la fertilidad de los rebaños afectados por esta enfermedad (Cox *et al.*, 1977; Carvalho *et al.*, 2012).

En concordancia con lo establecido con la literatura, sobre las lesiones de *Brucella ovis*, en carneros infectados naturalmente, en esta investigación se encontró que la cola del epidídimo (derecho) las lesiones fueron clasificadas de leves a moderadas en un 50%. Pero en la cola del epidídimo (izquierdo), las lesiones fueron de leves y moderadas a severas (Grafica 3). En el extremo de las lesiones observadas en carneros infectados experimentalmente con esta bacteria, el carnero 49 mostró lesiones más severas: formación de granulomas intraepiteliales espermáticos a nivel del tejido intersticial, con infiltración de linfocitos, células plasmáticas, macrófagos y fibras colágena en un proceso de inflamación granulomatosa.

En contra parte, las lesiones provocadas por la inoculación vía mucosas, a nivel rete testicular, solo se observó una degeneración testicular muy leve en el 16.66% de los testículos procedentes de los carneros sometidos a esta infección experimentalmente por la vía citada anteriormente (Grafica 4). Ello, en comparación con la degeneración testicular de forma leve a grave encontrada en el grupo de animales inoculados vía endovenosa (Grafica 5).

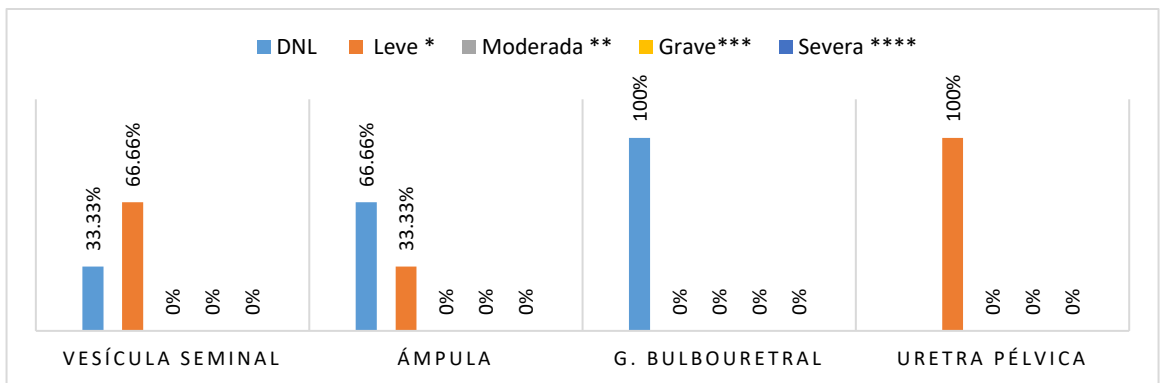


En cuanto a la proporción de individuos que presentaron lesiones en las glándulas anexas (Grafica 6), se observaron solo lesiones leves en las glándulas accesorias las cuales son hiperplasia de forma leve en los tejidos glandulares y solo algunas infiltraciones leves de linfocitos en las láminas basales. En la uretra pélvica solo se observó formas vesiculares de forma leve en la mucosa epitelial y de forma esporádica, no encontrando lesiones significativas. No obstante, las lesiones severas en estas glándulas se encontraron en el 66.6 y hasta el 100% de los individuos infectados experimentalmente vía mucosas.



Grafica 6. Lesiones en Glándulas Anexas Inoculación por Mucosas.

Mientras que, las lesiones en glándulas anexas en carneros infectados experimentalmente vía endovenosa (Grafica 7), las lesiones encontradas se clasificaron en leves (hiperplasia). Sin embargo, en algunos cortes se encontraron infiltrados de linfocitarios; pero, en su mayoría no se observó lesiones significativas en la uretra pélvica.



Grafica 7. Lesiones en Glándulas anexas, inoculación por vía endovenosa.

Los hallazgos histopatológicos encontrados en esta investigación, en torno a los efectos de *B. ovis*, concuerdan con otras investigaciones, en las cuales se sugiere que más del 50% de los carneros infectados naturalmente muestran lesiones en el epidídimo. Aspecto que explicaría la reducción en la calidad espermática, motilidad, concentración y morfología del espermatozoide y los efectos detrimentales en la fertilidad de los rebaños afectados por esta enfermedad (Cox *et al.*, 1977; Carvalho *et al.*, 2012).

8. CONCLUSION.

En el presente trabajo se observaron y evaluaron las lesiones histopatológicas del órgano más afectado por la infección experimental de *B. ovis*, siendo dicho órgano: el epidídimo izquierdo, principalmente la parte correspondiente a la cola. Las lesiones de *B. ovis* (cepa) presentan varios grados de afección, de los cuales la más importante es el proceso de induración, que puede presentarse cuando la infección es vía mucosa o endovenosa.

El segundo órgano con mayor afectación por la infección experimental con *B. ovis* (cepa) vía endovenosa es el testículo, el cual presenta lesiones leves pero significativas; puesto que incluye adherencias. Sin embargo, se debe destacar que este proceso de afectación es secundario al proceso producido en epidídimos como consecuencia de formaciones granulomatosas a nivel del epidídimo.

El resto de los órganos afectados por *B. ovis* (cepa), tal como la uretra pélvica, es generalizado; puesto que las lesiones se encuentran en el 100% de los carneros infectados experimentalmente por vía endovenosa o mucosas, aunque si bien, en la infección vía mucosas se presentan el mismo tipo de lesiones, pero con menor severidad. Lo mismo sucede en las glándulas anexas, ámpula, vesícula seminal, próstata, y bulbo uretral, las lesiones son leves y con presencia de adherencias en infección experimental con ambas vías de inoculación (mucosa y endovenosa).

Con la utilización de las técnicas de tinción de bacilos ácido alcohol resistente (BAAR) y la tinción de GRAM se pueden observar artefactos positivos en los epidídimos de carneros infectados experimentalmente con *B. ovis* (cepa), tanto por vía mucosas como endovenosa. Aspecto que, puede complementar la investigación en torno a esta enfermedad y profundizar en el proceso y en las lesiones que produce la infeccioso de la *B. ovis*.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Acha, N. P. (2001). Brucelosis. En N. P. Acha, *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales* (3a ed., Vol. 1, págs. 28-55). Organización Panamericana de la Salud.
- Alton, G. L. (1988). *Brucella ovis. Techniques for the brucellosis laboratory*. Paris: INRA.
- Antunes J., M. P., Allendorf, S. D., Appolinario, C. M., Cagnini, D. Q., Figueiredo, P. R., Junior, J. B., . . . Megid, J. (2013). Rough virulent strain of *Brucella ovis* induces pro-and an-ti-inflammatory cytokines in reproductive tissues in experimentally infected rams. *Vet. Microbiol.* 161, 339-343.
- Biberstein, E. M. (1964). Epididymitis in rams studies on pathogenesis. *Cornell Vet*, 54, 27-41.
- Brown G.M., P. D. (1973). Studies on the transmission of B. ovis infection of 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. (1990). Epididymitis in rams and lambs. *Vet. Clin. North Am, Food Anim. Pract.*, 6, 683-690.
- Bulgin, M. A. (s.f.). Association of sexual experience with isolation of various bacteria in cases of ovine epididymitis. *JAVMA*, 182, 372-374.
- Carvalho J.C.A., M. V. (2011). Andrological, Pathologic, morphometric, and ultrasonographic findings in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. *Small Ruminant Research*, 1-10.
- Carvalho, C. J., Moustacas, V. S., Xavier, M. N., Costa, E. A., Costa, L., Silva, T. M., . . . Santos, R. L. (2012). Andrological, pathologic, morphometric, and ultrasonographic findings in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. *Small Rumin. Res.* 102, 213-222.
- Castro, H. A., González, S. R., & Prat, M. I. (2005). *Brucelosis: una revisión práctica*. Buenos Aires.
- Cesar., E. M. (marzo del 2010.). *Aspectos de la Infección de Epididimitis del carnero por Brucella ovis y mellitensis*. . Torreon, Coahuila : Universidad Autónoma agraria Antonio Narro, Unidad Laguna. .
- Chen W., A. M. (1991). The potencial role of the ovine pharyngeal tonsil in respiratory tract immunity: A scanning and transmission electron microscopy study of its epithelium. *J. Com. Path.*, 104, 47-56.

-
- CloECKaert A., V. N. (2002). Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future. *Veterinary Microbiology*, 90, 229-247.
- Corbel, M. (1997). Brucellosis an overview. *Emerging Infectious Diseases*, 213-221.
- Costa, E. A., Santana, F. M., Carvalho, C. S., Moustacas, V. S., Silva, S. M., Paixao, T. A., & Santos, R. L. (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. Zoot.*, 751-754.
- Costa, L. ..., Nolaski, C. L., J.M.A., a., M.N, X., Costa Pixao, T., T.A., & Megidi, J. (2013). *Species Specific nested PCR as diagnostic tool for Brucella ovis infección in rams*, . Brazil : Arq. Bras. Med. vet. zoot. 65 (1): 55-60 .
- Costa, L., Nolaski, C. L., J.M.A., a., M.N, X., Costa Pixao, T., T.A., & Megidi, J. (2013). *Species Specific nested PCR as diagnostic tool for Brucella ovis infección in rams*,. Brazil: Arq. Bras. Med. vet. zoot. 65 (1): 55-60 .
- Cox, J. C., Gorrie, C. J., Nairn, R. C., & Ward, H. A. (1977). A comparison of methods for the serological diagnosis of *Brucella ovis* infection. *Br. Vet. J.* 133(5), 442-5.
- Cuevas P. M.A., H. A. (2008). Demostración de anticuerpos antiesperma en carneros experimentalmente infectados con *Actinobacillus seminis*. *Memoria AMTEO*, (págs. 1-3). Chiapas.
- Dostál J., V. L. (1995). immunosuppressive effect induced by intraperitoneal and rectal administration of boar seminal immunosuppressive factor. *Biol Reprod*, 52, 1209-1214.
- Dostal J., V. L. (1997). Inhibition of bacterial and boar epididymal sperm immunogenicity by boar seminal immunosuppressive component in mice. *J. Reprod Fertil*, 111, 135-141.
- Edna B. Prophet, B. M. (1995). *Métodos Histotecnológicos* (Publicado por el Registro de Patología de los Estados Unidos de América (ARP) Washington D.C. ed.). Washington, D.C.: Preparado por el Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América. (AFIP) Washington D.C.
- Estein, S. (1999). Aspectos inmunológicos en el diagnóstico y control de la Epididimitis contagiosa del carnero por *Brucella ovis*. Immunological aspects in the diagnosis and control of contagious epididimitis of rams by *Brucella ovis*. *Arch. Med. Vet.*, 31, 18.
- Ficapal, A. J. (1998). Diagnosis and epidemiology of *brucella ovis* infection in rams. *Small Ruminant Research*, 29, 13-19.
- Foster R.A., L. P. (1988). Immunoglobulins and immunoglobulin-containing cells in the reproductive tract of normal rams. *Aust. Vet J.*, 65, 16-20.
-

-
- Foster R.A., L. P. (1988). Immunoglobulins and immunoglobulin-contains cells in the reproductive tract of normal rams naturally infected with *Brucella ovis*. *Aust. Vet. J.* 1988, 65, 37-40.
- Frandsen, R. D., & Spurgeon, T. L. (1995). *Anatomía y fisiología de los animales domésticos* (McGRAW-HILL ed.). México: Interamericana.
- G.M., M. (2007b). Cell preparation. En *Flow cytometry principles and applications*. New Jersey: Human Press Inc.
- Galindo R.C., M. P. (2009). Differential expression of inflammatory and immune response genes in rams experimentally infected with a rough virulent strain of *Brucella ovis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 127, 295-303.
- Galvez C.E.A., Y. A. (7-11 de septiembre de 2009). Estandarización de la prueba de PCR múltiple para el diagnóstico de *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* e *Histophilus somni* en el semen de carneros. *5° Congreso Latinoamericano de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos*. Querétaro.
- García, J. (1987). *Epidemiología en animales domésticos, control de enfermedades*. Distrito Federal: Trillas.
- Godfrid J., S. H. (2011). Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21 st century.
- Gogolin-Ewens K.J., M. C. (1985). Sheep lymphocyte antigens (OLA). I. Major Histocompatibility complex class I Molecules. *Immunology*, 56, 717-723.
- Gómez C.P., C. M. (2006). *Brucella* spp. noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microbial cell factories*, 5-13.
- González M.J., C. L. (1994). *Brucella ovis* infection in two flocks of sheep. *Veterinary Record*, 135, 254-256.
- Gutiérrez Hernández , J. L., Garrido Fariña , G. I., Acosta Dibarrat , J. P., Díaz Aparicio, E., Tenorio Gutiérrez , V. R., & Tórtora Pérez , J. L. (2015). Diagnóstico serológico, histopatológico y molecular de epididimitis ovina en carneros de Zacatecas, Mexico . *Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal-Universidad Autónoma del Estado de México* .
- Hughes, K. (1972). Experimental *Brucella ovis* infection in ewes. 2. correlation of infection and Complement Fixation titres. *Australian Veterinary Journal*, 48, 18-22.
- Hungerford, T. (1975). *Diseases of livestock*. (Eighth ed.). Sidney Australia, Australia: Mc Graw-Hill.
- INEGI. (2022).

-
- Jiménez de Bagüés, M. D. (2005). Celular bioterrorism: how brucella corrupts macrophage physiology to promote invasion and proliferation. *Clinical Immunology*, 114, 227-238.
- Jiménez de Bagüés, M. E. (1994). Protective immunity to *Brucella ovis* in balb/c mice following recovery from primary infection or immunization with subcellular vaccines. *Infec. Immun.*, 62, 632-638.
- Kimberling, C. (1987). *Diseases of Sheep Jensen and Swift's* (Third edition ed.). Lea & Febiger.
- Laws L., S. G. (June de 1972). Experimental *Brucella ovis* infection in rams. *Australian Veterinary Journal*, 48, 313-317.
- Leal K. D.S., B. P. (1999). Epidemiología molecular de un foco primario de brucelosis en el Estado de México. *Biotecnología Aplicada*, 16, 149-153.
- Liebler-Tenorio E.M., P. R. (2006). Malt structure and function in farm animals. *Vet Res*, 37, 257-280.
- López Mayagoitia , A., Martínez Chavarría , L. C., Martínez Racine , I., Romero Romero , L., Salas Garrido , G., Trigo Tavera , F. J., . . . Vanda Cantón , B. (2017). *Patología General Veterinaria*. México: Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- López, G. A. (2007). *Estudio de Brucelosis causada por Brucella ovis y personal en riesgo*. Valencia : Universidad Politécnica de Valencia, Departamento de Ciencia Animal.
- Lunn, D. (2001). Pharyngeal lymphoid tissue: gatekeeper or showstopper? *Equine veterinary Journal*, 218-219.
- M.J., C. (1997). Brucellosis an Overview. *Emerging Infectious Diseases*, 213-221.
- Manual Terrestre de la OIE*. (2018).
- Mariana, N. T. (2010). Development and evaluation of a species-specific PCR assay for the detection of *Brucella ovis* infection in rams. *Veterinary Microbiology*, 145, 158-164.
- Marion, G. (2007a). Quality control in flow cytometry . En *In flow Cytometry principles and applications*. New Jersey: Human Press Inc.
- Martí E., P. P. (2006). Comparative study of four different sperm washing methods using apoptotic markers in ram spermatozoa. *J. Androl.*, 27, 746-753.
- Martí E., P. P. (2008). Study of apoptosis related markers in ram spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, 106, 113-132.

-
- Merchant, I., & Parker, y. (1975). *Bacteriología Y Virología Veterinaria* . Zaragoza España: Acribia.
- Moldoveanu Z., H. W. (2005). Human male genital tract secretions: both mucosal and systemic immune compartments contribute to the humoral immunity. *J. immunol*, 175, 4125-4136.
- Montaña N.I., R. O. (1998). Medición de la respuesta inmune humoral y celular frente a antígenos de *Brucella abortus* RB51 en bovinos. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 30.
- Paasch U., G. S. (2003). Deterioration of plasma membrane is associated with activated caspases in human spermatozoa. *J. Androl.*, 24, 246-252.
- Padrón Ganadero Nacional, registro integral del sector pecuario* . (01 de marzo de 2018). Obtenido de Padrón Ganadero Nacional, registro integral del sector pecuario : Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural
- Paolicchi F., P. S. (s.f.). *Aislamiento de Brucella ovis del tracto genital y leche de ovejas con persistencia de títulos positivos a ELISA*. Recuperado el 14 de noviembre de 2011, de www.produccionbovina.com/.../58-OvisVersion%20Argentina.pdf: http://www.produccionbovina.com/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/enfermedades_reproduccion/58-OvisVersion%20Argentina.pdf
- Paolicchi, F. (2001). Epidermitis Ovina por *Brucella ovis*: Lesiones Genitales y Respuesta Inmune Antiespermática . *Medicina Veterinaria* .
- Paolicchi, F. T. (1991). Estudio comparativo de medios de cultivo para aislar *Brucella ovis*. *Rev. Arg. Microbiol.*, 23, 155-159.
- Parker, M. . (1975.). *Bacteriología y Virología Veterinaria* . Zaragoza España: Acribia.
- Perez Martinez, J. A., Vazquez Martinez, J. R., Rodriguez Sanchez , M. C., Miranda Morales , R. E., Romo Garcia , A. L., & Nader Garcia , E. (1987). *Universidad Nacional Autonoma De Mexico Procedimientos De Laboratorio Para Bacteriología y Micología Veterinaria* : Mexico : Facultad De Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Plant, J. E. (December de 1986). Serological, bacteriological and pathological changes in rams following different routes of exposure to *Brucella ovis*. *Australian Veterinary Journal*, 63(12), 9-12.
- Prophet, E. B., Mills, B., Arrington , J. B., & Sobin, L. H. (1995). *Métodos Histotecnológicos* . Estados Unidos de America : Washinton .
- Radostits, O. B. (1994). Diseases caused by *Brucella* spp. En *Veterinary Medicine* (8a. ed.). London: Baillière Tynhall, W.B. Saunders & Co.

-
- Ridler, A. y. (2002). Effects of brucella ovis infection on semen characteristics of 16-month-old red deer stags. *New Zeland Veterinary Journal*, 50(1), 19-22.
- Robles, C. (1998). *Epidimitis Contagiosa de los Carneros por B. ovis*. Argentina.
- SADER. (29 de Noviembre de 2017). *Gobierno de México* . Obtenido de Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural: <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/la-ovinocultura-una-actividad-muy-arropadora#:~:text=En%20M%C3%A9xico%2C%20en%20general%2C%20el,Debouillet%2C%20Merino%20australiano%20y%20Lincoln>.
- Sakkas D., M. E. (1999). Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev. Reprod.*, 4, 31-37.
- Sakkas D., M. G. (2000). The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. *Hum. Reprod.*, 15, 1112-1116.
- Sánchez O, A., Fuentes L, J. A., López , R. M., Lucio , D. R., Acosta , D. J., Bedolla J, L. C., & Sánchez P, V. M. (2018). Lesiones histopatológicas del aparato reproductor de carneros infectados experimentalmente con *Brucella ovis*. *Amteo, XIX CONGRESO INTERNACIONAL DE OVINOCULTURA*.
- Sánchez Parra, V. M. (2018). *Evaluación de la respuesta inmune y las alteraciones seminales en la infección experimental con brucella ovis (grado de doctor en ciencias agropecuarias y recursos naturales)*. México.
- Sánchez Parra, V. M., Soriano Vargas, E., Peñuelas Rivas, C. G., Ortiz Rodríguez , R., Alverto Paolicchi, F., Valente Ordeñez , V., . . . Acosta Dibarrat, J. (2018). Evaluación serológica y clínico patológica a través de las pruebas de IGDA y ELISA en carneros inoculados experimentalmente con *Brucella ovis*. *FVC-LUZ / Vol. XXVIII, Nº 3*, 199-207.
- Saravanamuthu V., F. R. (1991). T and B lymphocyte subsets i spermatid granulomas in five rams. *Vet Pathol*, 28, 482-491.
- SIAP. (2020). *Atas Agroalimentario. Servicio De Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP)*.
- Vasselon T., D. P. (2002). Toll receptors: a central element in innate immune responses. *70(3)*, 1033-1041.
- Vela O.A., B. R. (1997). *Bases de salud pública para estudiantes de medicina veterinaria y zootecnia*. Toluca: Universidad Autónoma del Estado de México.
- Walker R.L., L. B. (1986). association of age of ram with distribution of epididymal lesions and etiologic agent. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 188, 393-396.

Younglai E.V., H. D. (2001). Sperm swim-up techniques and DNA fragmentation. *Hum. Reprod.*, 16, 1950-1953.

Zammit, T. (1905). Una nota preliminar sobre la susceptibilidad de las cabras a la fiebre de malta.

10. ANEXO DE TINCIONES.

METODO FITE PARA BACTERIAS ACIDO ALCOHOL RESISTENTE.

Fijación: Formalina neutra al 10 %, estabilizada.

SOLUCIÓN DE ACEITE DE MANÍ-XILENO.

Aceite de maní.1 una parte.
Xileno..... 2 partes.

Solución Carbol-Fucsina de Ziehl-Neelsen

Cristales fenol derretidos2.5 mL.
Alcohol etílico absoluto.....5.0 mL.
Fucsina básica..... 0.5 mL.
Agua destilada.....50.0 mL.

Filtrar antes de usar.

Solución Alcohólica Ácida al 1% (C.3).

Solución de Matriz de Azul de Metileno (C.3).

Solución diaria de Azul de Metileno.

Solución Matriz de azul de metileno.....10.0 mL.

Agua Corriente.....90.0 mL.

Procedimiento:

- 1.- Desparafinizar las láminas a través de la solución de aceite de maní-xileno, dos veces durante 12 minutos cada uno.
- 2.- Dejar secar las láminas al aire durante 15 minutos, la capa delgada de aceite que permanece en la lámina, ayuda a prevenir el daño y la contracción del tejido.
- 3.- Colorear con carbol-fucsina filtrada durante 30 minutos.
- 4.- Lavar con agua durante 3 minutos.
- 5.- Diferenciar las láminas con solución alcohólica ácida hasta que las secciones aparezcan de color rosa pálido.
- 6.- lavar con agua corriente, durante tres minutos.
- 7.- Contrastar con solución diaria de azul de metileno.
- 8.- Enjuagar con agua el exceso de la solución diaria de azul de metileno.

9.- Deshidratar las láminas rápidamente a través de alcohol etílico al 95% y alcohol etílico absoluto, dos veces cada uno. No dejar las láminas en alcohol.

10.- Aclarar con xileno, dos cambios, dos minutos cada uno.

Resultados:

Bacilos de lepra y otros bacilos ácido alcohol resistentes Rojos.

FondoAzul pálido.

COLORACION DE BROWN Y BRENN (GRAM).

Fijación: Formalina neutra al 10% estabilizada.

Secciones de parafina de 6 micrones.

Soluciones:

Solución de Cristal Violeta (C.3).

Solución de bicarbonato de sodio al 0.25%.

Solución Diaria de Fucsina Básica.

Fucsina básica matriz.....10.0 mL.

Agua destilada..... 90.0 mL.

Acetona.

Solución de ácido pícrico – acetona..... .0.1 gr.

Acetona100.0 mL

Solución de acetona – xileno.

Acetona.....50.0 mL.

Xileno.....50.0 mL.

Procedimiento.

- 1.- Desparafinizar e hidratar hasta llegar al agua destilada.
- 2.- Colocar las láminas sobre un soporte teñido y colocar 1 mL. (20 gotas) de la solución de cristal violeta y agregar cinco gotas de solución de bicarbonato de sodio al 5% durante un minuto. Agitar suavemente. La solución puede mezclarse antes de ser usada.
- 3.- Enjuagar con agua.
- 4.- Empapara las láminas con la solución de yodo de Gram, dúrate 1 minuto.
- 5.- Enjuagar con agua.
- 6.- Descolorar con acetona.
- 7.- Enjuagar con agua.
- 8.- Enjuagar las láminas con la solución diaria de fucsina básica, durante 1 minuto. Enjuagar.

-
- 9.- Colocar las láminas en un frasco de Coplin con agua.^b
 - 10.- Sumergir las láminas individualmente en acetona para comenzar la reacción.
 - 11.-Diferenciar inmediatamente cada lámina con la solución de ácido pícricoacetona hasta que las secciones aparezcan de un color amarillento rosado.
 - 12.- Enjuagar rápidamente con acetona, luego con la solución de acetona-xilol.
 - 13.- Aclarar con xileno, 2 veces y montar con un medio resinoso.

Observaciones.

Bacterias Gram-positivas	Azul
Bacterias Gram negativas	Rojo
Filamentos de Nocardia y Actinomicetas	Azul
Núcleos	Rojo
Otros elementos tisulares	Amarillo

Originalmente se usaba una solución de etil-éter-acetona para descolorar las secciones secas con papel secante. Por razones de seguridad en el laboratorio, el uso de etil-éter se ha eliminado y se usa la acetona para descolorar.

Las láminas permanecen en agua antes de colocarlas en acetona. Las láminas ya no se secan con "papel secante" antes de colocarlas en acetona. (Edna B. Prophet, 1995).

PROCEDIMIENTOS DE HEMATOXILINA & EOSINA DE HARRIS.

FIJACION: Formalina neutra al 10%, estabilizada, fijadores de Bonuin o de Zenker.

SOLUCIONES: En parafina, celoidina o por congelación, en 3 a 20 micrones.

Solución.

ÁLCOHOL ACIDO AL 1% (C.3).

AGUA AMONICAL (C.3).

SOLUCION SATURADA DE CARBONATO DE LITIO (C.3).

SOLUCION DE EOSINA-FLOXINA

HEMATOXILINA DE HARRIS

Hematoxilina	5.0 g
Etanol al 100%	50.0 mL
Alumbre de potasio o de amonio	100.0 mL
Agua destilada	1000.0 mL
Oxido rojo de mercurio	2.5 g

Use un frasco de 2000 mL para el alumbre y agua, y uno más pequeño para el etanol y la hematoxilina. Disuelve completamente el alumbre en el agua destilada con la ayuda de calor y de un agitador magnético. Agite vigorosamente para disolver la hematoxilina en alcohol, a temperatura ambiente. Remueva el alumbre y el agua destilada de la fuente de calar. Lentamente combine las dos soluciones. Devuelva las soluciones ya combinadas a la fuente de calor. Haga hervir la mezcla tan rápido como sea posible, aproximadamente 1 minuto o menos. Remueva del calor y lentamente añada el óxido de mercurio. Si el óxido de mercurio añade muy rápidamente, la reacción hará que la solución hierva y se derrame. Devuelva la solución a la fuente de calor hasta que se torne de un calor púrpura oscuro, remuévala del calor, y póngala en un recipiente con agua fría hasta que baje la temperatura. La solución entonces está lista. Añada 20 mL de ácido acético glacial para intensificar la tinción nuclear. Filtrar la solución cada vez antes de usar.

Procedimiento.

1. Desparafine las láminas e hidrate hasta llegar al agua destilada, antes de teñir.
2. Tiña en hematoxilina de Harris, filtrada recientemente, de 6 a 15 minuto.
1. Lave en agua corriente de 2 a 5 minutos.
2. Diferencie en alcohol ácido al 1%, 1 to 2 remojones.
3. Lave brevemente en agua corriente.
4. Coloque las láminas en una solución débil de agua amortiguadora o en una solución saturada de carbonato de litio hasta que las secciones se vean de un color azul brillante.
- 7.- Lave concienzudamente en agua corriente por 10 minutos.
- 8.- Coloque en etanol al 80% por uno u dos minutos.

9.- Contraste con una solución de eosina-floxina por 2 minutos.

10.- Deshidrate y aclare a través de dos cambios de etanol al 95% cada uno, luego etanol absoluto, y luego xileno, dos minutos en cada cambio.

11.- montar con medio resinoso.

Observaciones.

Núcleos..... Azul.

Citoplasma.....Rosado a rojo.

La mayoría de los tejidos.....Rosado al rojo.

11. ANEXO DE RESULTADOS

Tabla 3. Inoculación en mucosas de *B. ovis* (01Zac-INIFAP) en la mucosa conjuntival y prepucial.

Animal	Mem-Nict	Ganglio-Ing	Vesi.Sem	Ámpula	T-Der		T-Izq		Glán Buv-Ur	Epidd.Der			Epidd.Izq			Ure.Pelv
					Rete-Tes	Cap.Tes	Rete-Tes	Cap.Tes		Cabeza	Cuerpo	Cola	Cabeza	Cuerpo	Cola	
39	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	*	**	*	*	*	NDL
44	NDL	NDL	NDL	NDL	**	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	**	NDL	NDL	**	NDL
68	NDL	NDL	*	*	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	*	**	*	*	**	NDL
67	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	**	NDL	NDL	*	*
61	NDL	NDL	*	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	*	NDL	*	*	NDL
37	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	**	NDL	***	**	*	*	*

Mem-Nict= Membrana Nictitante, Ganglio-Ing= Ganglio inguinal, Vesi.Sem= Vesícula Seminal, T-Der= Testículo Derecho, Rete-Tes= Rete Testicular, Cap.Tes = Capsula Testicular, T-Izq= Testículo Izquierdo, Glán Buv-Ur= Glándula Bulbo Uretral, Epidd.Der= Epidídimo Derecho, Epidd.Izq= Epidídimo Izquierdo, Ure.Pelv= Uretra Pélvica, grado*= grupo uno lesión leve incluyen edema intersticial y exudación serofibrinosa; grado**= grupo dos lesión moderada incluye hiperplasia del epitelio epidídimal con formación de vesículas intraepiteliales y acumulación de linfocitos en áreas peri vasculares basales; grado***= grupo tres lesión grave incluyeran adherencias y granulomas espermáticos, grado ****= grupo cuatro incluye una lesión severa, donde se observan los granulomas interespermáticos a nivel intersticial, con la oinfiltración de histicitos y linfocitos y fibroblastos, ^{NDL} = no se determina lesiones.

Tabla 4. Inoculación de *B. ovis* (01Zac-INIFAP) vía intravenosa.

Animal	Mem-Nict	Ganglio-Ing	Vesi.Sem	Ámpula	T-Der		T-Izq		Glán Buv-Ur	Epidd.Der			Epidd.Izq			Ure. Pelv
					Rete-Tes	Cap.Tes	Rete-Tes	Cap.Tes		Cabeza	Cuerpo	Cola	Cabeza	Cuerpo	Cola	
45	NDL	NDL	*	*	**	**	**	**	NDL	***	**	**	*	***	**	*
36	NDL	NDL	NDL	NDL	**	**	**	**	NDL	**	NDL	**	NDL	*	*	*
49	NDL	NDL	*	*	*	*	*	*	NDL	**	NDL	**	***	***	****	*
38	NDL	NDL	NDL	NDL	*	*	**	*	NDL	**	NDL	*	*	NDL	**	*
56	NDL	NDL	*	NDL	**	**	*	*	NDL	**	NDL	*	NDL	*	**	*
50	NDL	NDL	*	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	**	*	*	*	NDL	**	*

Mem-Nict= Membrana Nictitante, Ganglio-Ing= Ganglio Inguinal, Vesi.Sem= Vesícula Seminal, T-Der= Testículo Derecho, Rete-Tes= Rete Testicular, Cap.Tes = Capsula Testicular, T-Izq= Testículo Izquierdo, Glán Buv-Ur= Glándula Bulbo Uretral, Epidd.Der= Epidídimo Derecho, Epidd.Izq= Epidídimo Izquierdo, Ure.Pelv= Uretra Pélvica, grado*= grupo uno lesión leve incluyen edema intersticial y exudación serofibrinosa; grado**= grupo dos lesión moderado incluye hiperplasia del epitelio epidídimo con formación de vesículas intraepiteliales y acumulación de linfocitos en áreas perivasculares basales; grado***= grupo tres lesión grave incluyeran adherencias y granulomas; grado ****= grupo cuatro incluye una lesión severa, donde se observan los granulomas interespermáticos a nivel intersticial, con la infiltración de histiocitos y linfocitos y fibroblastos, ^{NDL} = no se determina lesiones.

Tabla 5. Inoculación conjuntival y prepucial con solución salina de fosfato al 0,9 %, (control).

Animal	Mem-Nict	Ganglio-Ing	Vesi.Sem	Ámpula	T-Der		T-Izq		Glán Buv-Ur	Epidd.Der			Epidd.Izq			Ure.Pelv
					Rete-Tes	Cap.Tes	Rete-Tes	Cap.Tes		Cabeza	Cuerpo	Cola	Cabeza	Cuerpo	Cola	
35	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL
58	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL
43	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL
40	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL
42	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL
65	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL	NDL

Mem-Nict= Membrana Nictitante, Ganglio-Ing= Ganglio inguinal, Vesi.Sem= Vesícula Seminal, T-Der= Testículo Derecho, Rete-Tes= Rete Testicular, Cap.Tes = Capsula Testicular, T-Izq= Testículo Izquierdo, Glán Buv-Ur= Glándula Bulbo Uretral, Epidd.Der= Epidídimo Derecho, Epidd.Izq= Epidídimo Izquierdo, Ure.Pelv= Uretra Pélvica, grado*= grupo uno lesión leve incluyen edema intersticial y exudación serofibrinosa; grado**= grupo dos lesión moderado incluye hiperplasia del epitelio epidídimal con formación de vesículas intraepiteliales y acumulación de linfocitos en áreas perivasculares basales; grado***= grupo tres lesión grave incluyeran adherencias y granulomas, grado ****= grupo cuatro incluye una lesión severa, donde se observan los granulomas interespermáticos a nivel intersticial, con la oinfiltración de histocitos y linfocitos y fibroblastos, ^{NDL} = no se determina lesiones.

12.ANEXO: IMÁGENES HISTOLÓGICAS DE LAS LESIONES

Vesícula seminal de los carneros que fueron inoculados por vía intravenosa (49, 56 y 50), conjuntival y prepucial (61 y 68), donde se observa una lesión leve infiltrado de linfocitos y polimorfonucleares a la luz de la glándula (flecha negra) (figura 3).

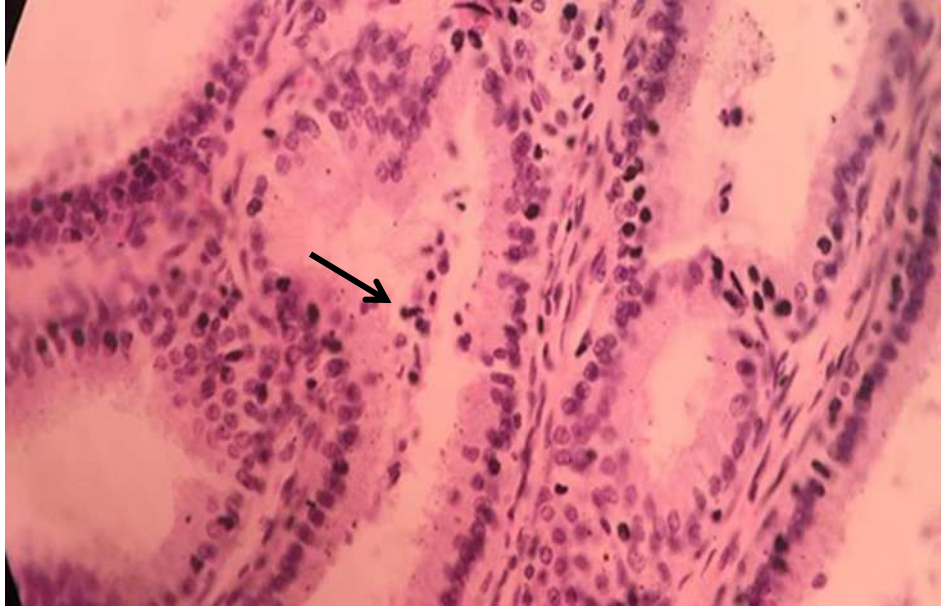


Figura 3. Microfotografía 40x del corte vesícula seminal.

Ámpula se observa una lesión leve; infiltrado de linfocitos y polimorfonucleares en la luz de un sáculo (flecha negra 1), semen en un sáculo (flecha negra 2), líquido ámpula en un sáculo (flecha negra 3) (figura 4).

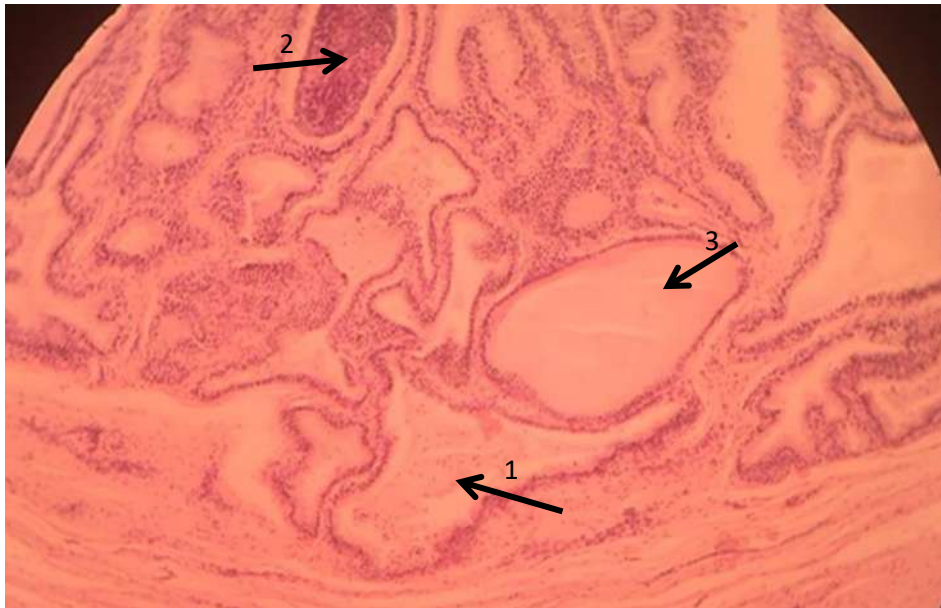


Figura 4. Microfotografía 10x del corte de ámpula.

El rete testicular derecho de los carneros que fueron inoculados por vía intravenosa (45, 35 y 56), conjuntival y prepucial (44), donde se observa una moderada; degeneración de los túbulos seminíferos (flecha negra) (figura 5).

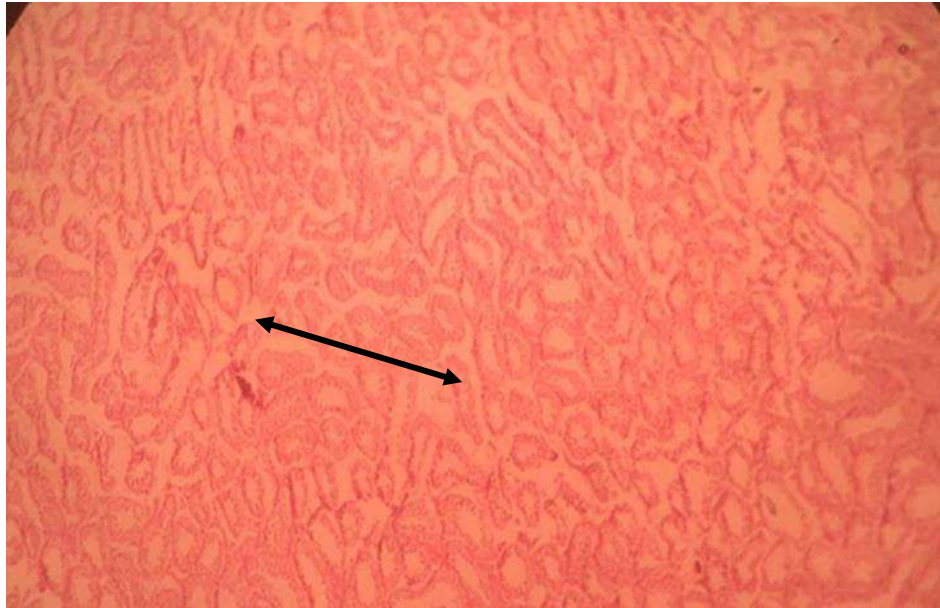


Figura 5. Microfotografía 4x del corte testículo derecho del rete testicular.

Rete testicular derecho de los carneros que fueron inoculadas por vía conjuntival y prepucial (49 y 38), donde se observa una lesión leve; edema intersticial (flecha negra) (figura 6).

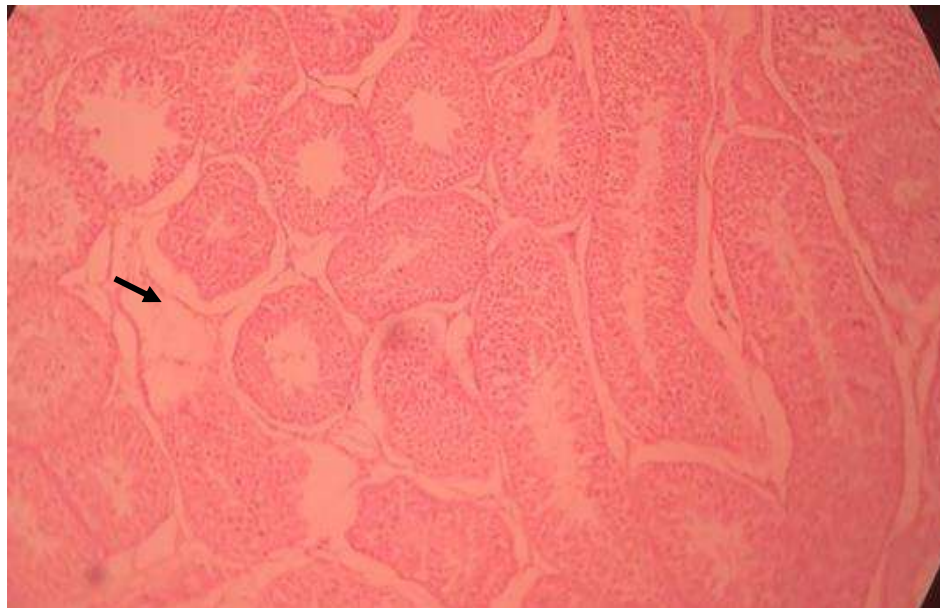


Figura 6. Microfotografía 10x del corte testículo derecho del rete testicular.

La cápsula testicular derecha de los carneros que fueron inoculados por vía intravenosa (45, 36 y 56), donde se observa una moderada; degeneración del epitelio testicular (flecha negra 1), cápsula testicular (flecha negra 2) (figura 7).

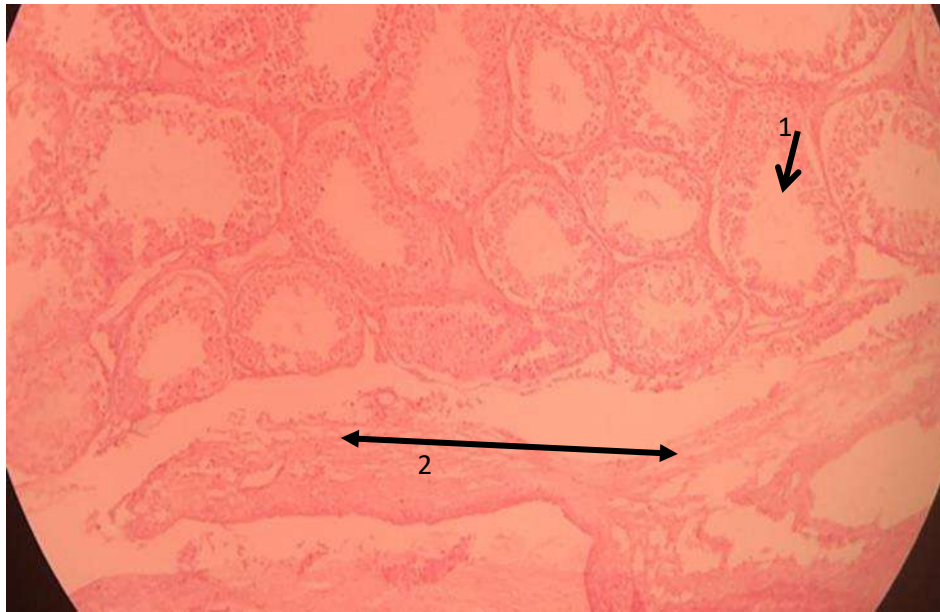


Figura 7. Microfotografía 10x del corte testículo derecho cápsula testicular.

Cápsula testicular derecha de los carneros que fueron inoculados por vía intravenosa (49 y 38), donde se observa una lesión leve; degeneración del epitelio testicular y edema intersticial (flecha negra 1), cápsula testicular (flecha negra 2) (figura 8).

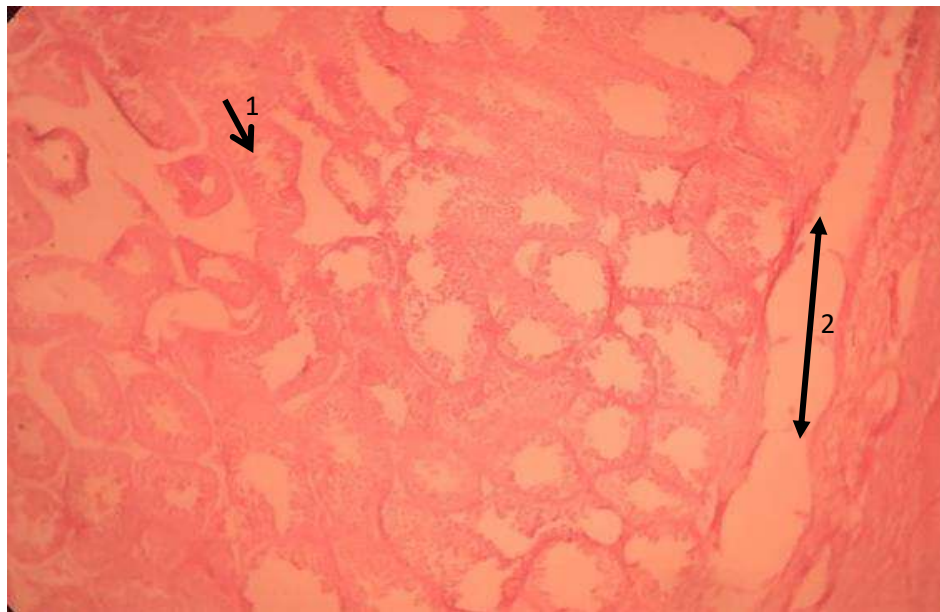


Figura 8. Microfotografía 10x del corte testículo derecho cápsula testicular.

Rete testicular izquierdo de los carneros que fueron inoculados por vía intravenosa (45, 36 y 38), teñidos con Hematoxilina y Eosina, donde se observa una lesión moderada; degeneración epitelial testicular (flecha negra 1), edema intersticial (flecha negra 2) (figura 9).

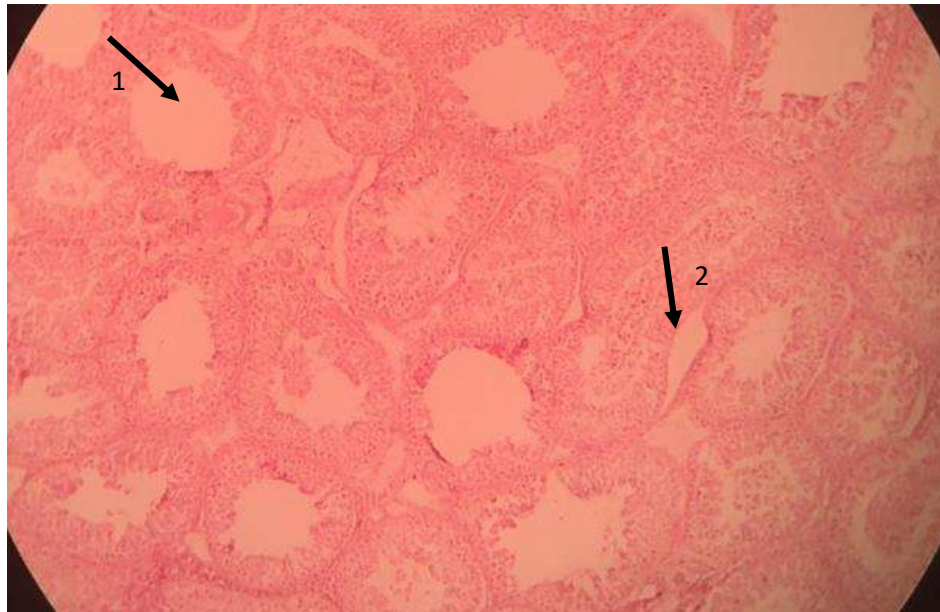


Figura 9. Microfotografía 10x del corte testículo izquierdo rete testicular.

Rete testicular izquierdo de los carneros que fueron inoculados por vía intravenosa (49 y 56), donde se observa una lesión leve; degeneración del epitelio testicular (flecha negra) (figura 10).



Figura 10. Microfotografía 10x del corte testículo izquierdo rete testicular.

Cápsula testicular izquierdo de los carneros que fueron inoculas por vía intravenosa (45 y 36), teñido con Hematoxilina y Eosina, donde se observa una lesión moderada degeneración (flecha negra) (figura 11).

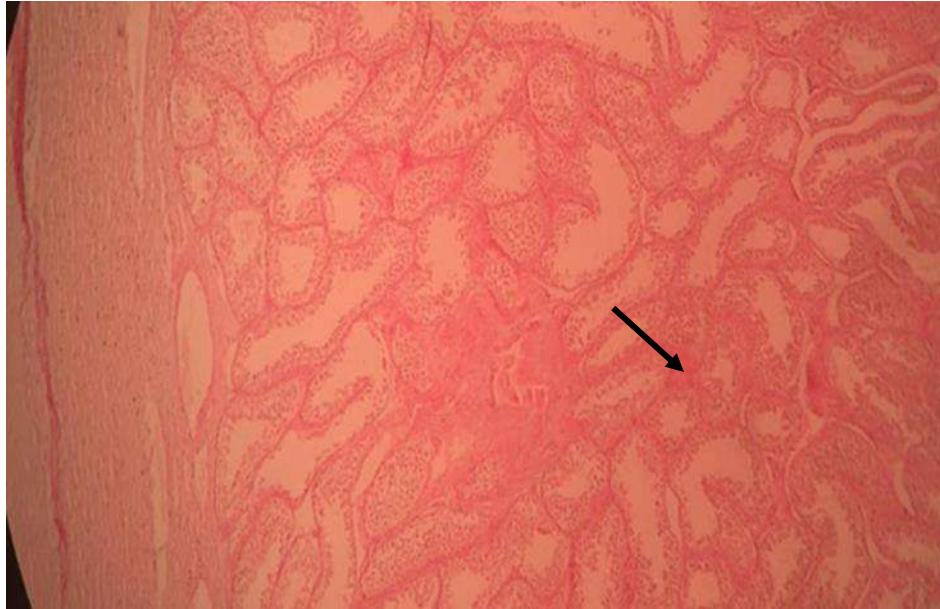


Figura 11. Microfotografía 10x del corte testículo izquierdo cápsula testicular.

Capsula testicular izquierdo de los carneros que fueron inoculas por vía intravenosa (49, 38 y 56), teñido con Hematoxilina y Eosina, donde se observa una lesión leve degeneración testicular (flecha negra) (figura 12).

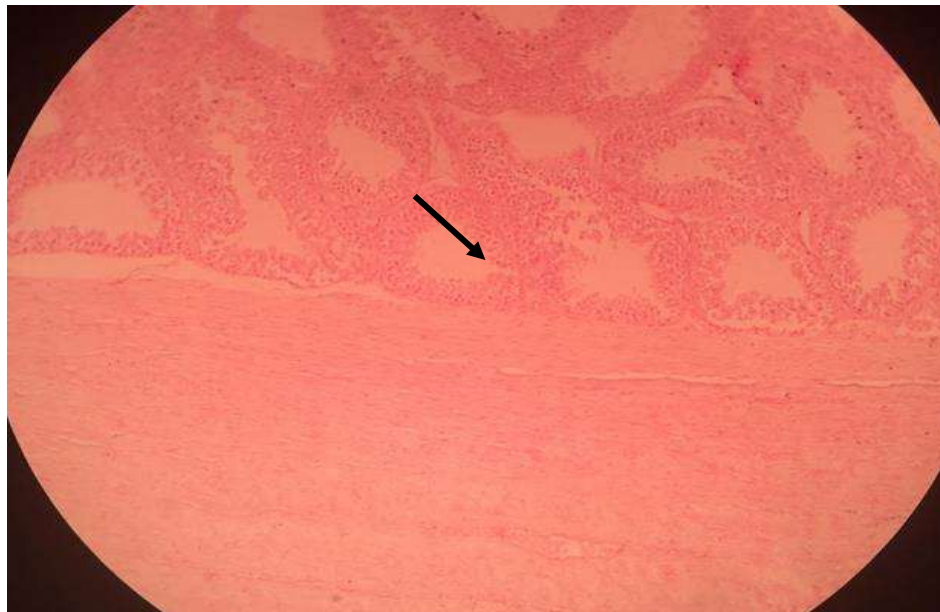


Figura 12. Microfotografía 10x del corte testículo izquierdo cápsula testicular.

Cabeza del epidídimo derecho de los carneros que fueron inoculadas por la mucosa conjuntival y prepucial (37), y vía intravenosa (36, 49, 38, 56 y 50), teñido con Hematoxilina y Eosina, donde se observa una lesión moderada con edema intersticial e infiltración de linfocitos e histiocitos y macrófagos en las láminas basales epiteliales y formación de quistes intraespemáticos (flecha negra) (figura 13).

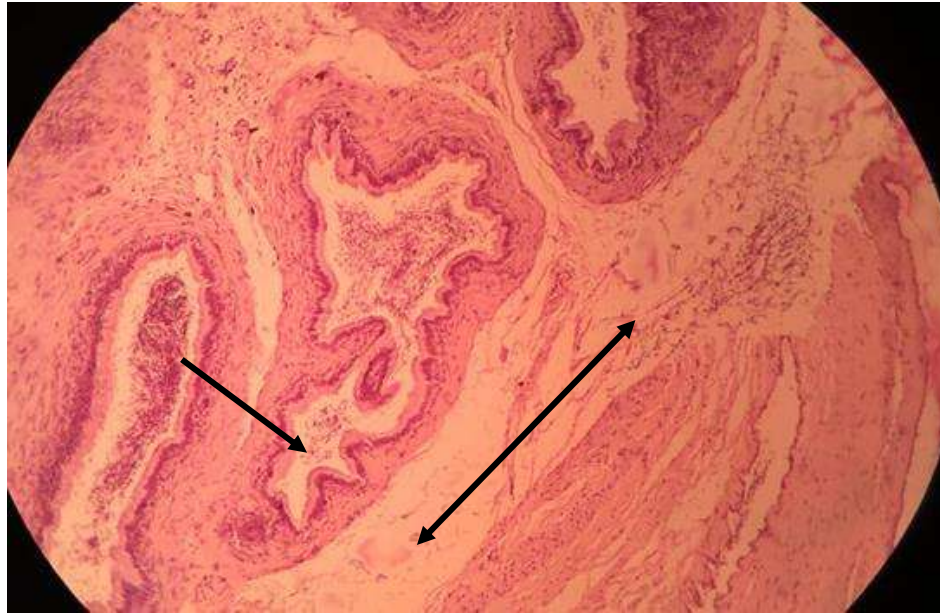


Figura 13. Microfotografía 10x corte de la cabeza del epidídimo derecho.

Cabeza del epidídimo derecho inoculación por la vía intravenosa (45), teñido con Hematoxilina y Eosina, donde se observa una lesión grave, Quiste intraepitelial, hipertrofia del epitelio del epidídimo y atrofia de los estereocilios epiteliales (flecha negra) (figura 14).

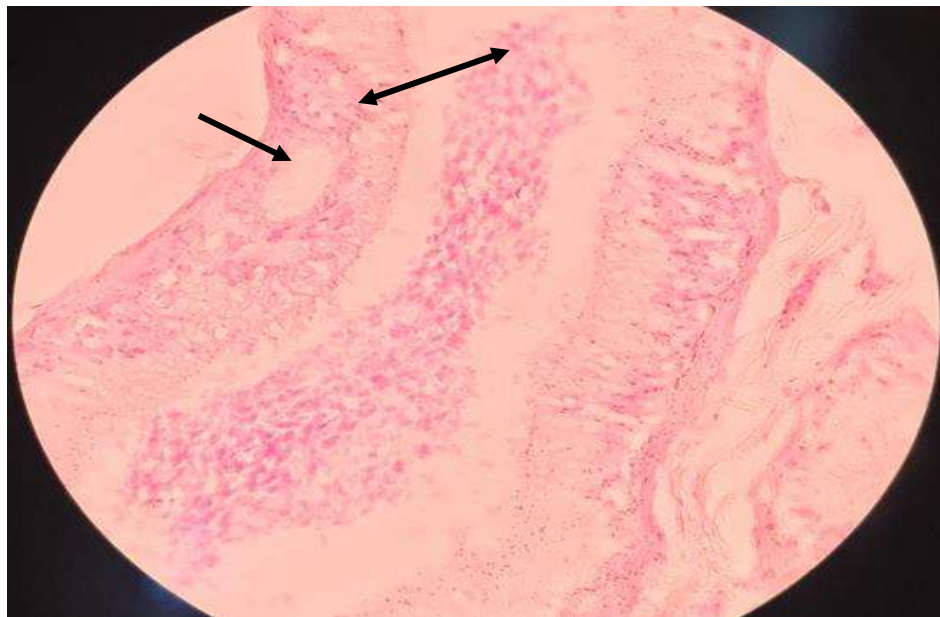


Figura 14. Microfotografía 40x del corte cabeza del epidídimo.

Cuerpo del epidídimo derecho de los carneros que fueron inoculados por la mucosa conjuntival y prepucial (39 y 68), y vía intravenosa (50), teñido con Hematoxilina y Eosina, donde se observa una lesión leve de infiltración perivascular de linfocitos y polimorfonucleares, además de edema intersticial (flecha negra) (figura 15).

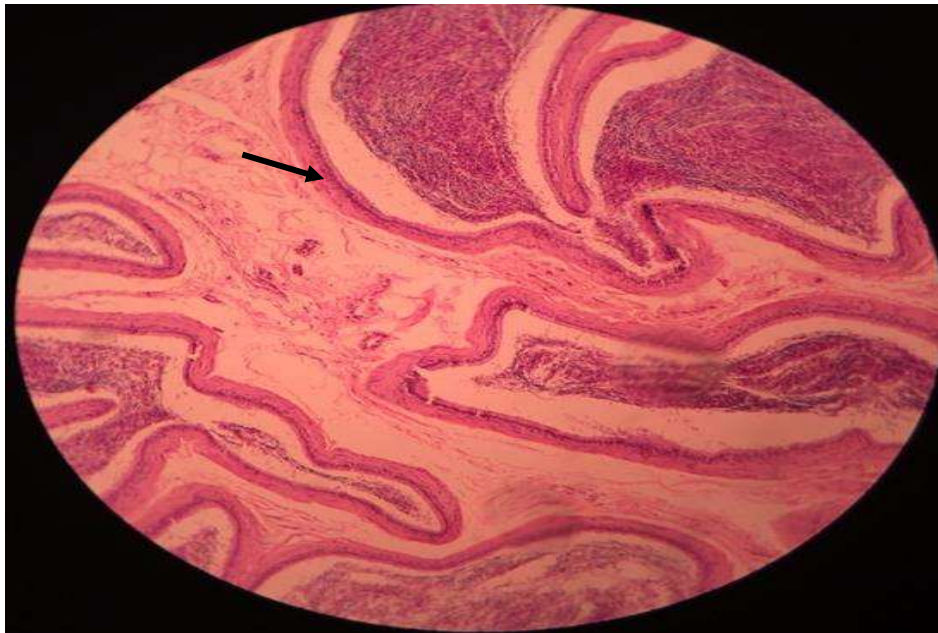


Figura 15. Microfotografía 10x del corte cuerpo del epidídimo derecho.

Cuerpo del epidídimo derecho de los carneros que fueron inoculados por vía intravenosa (50), teñido con Hematoxilina y Eosina, donde se observa una lesión moderada. Con la formación de quistes espermáticos intersticiales (flecha negra) (figura 16).

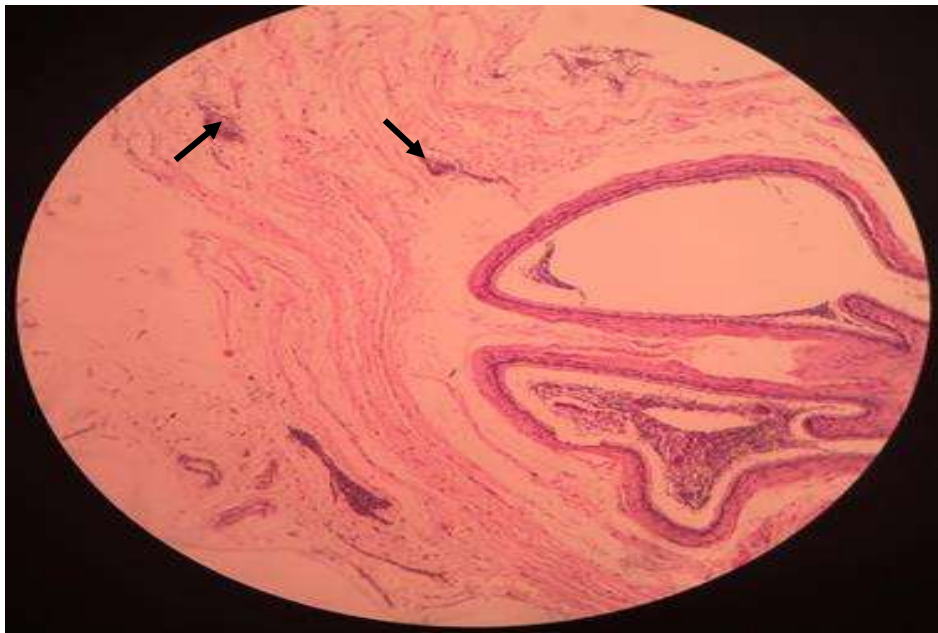


Figura 16. Microfotografía 10x del corte del cuerpo del epidídimo derecho.

Cola del epidídimo derecho de los carneros que fueron inoculados por vía intravenosa (38, 56 y 50), y mucosa conjuntival y prepucial (61), teñido con Hematoxilina y Eosina, donde se observa una lesión leve, edema intersticial (flecha negra) (figura 17).

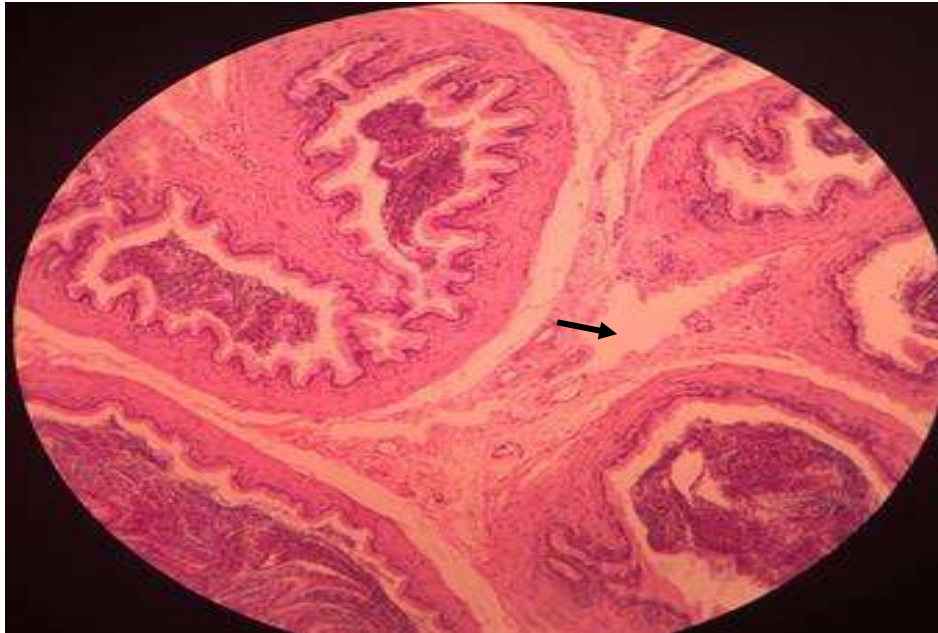


Figura 17. Microfotografía 10x del corte la cola del epidídimo derecho.

Cola del epidídimo derecho de los carneros que fueron inoculados por vía intravenosa (45, 36 y 49), y mucosa conjuntival y prepucial (39, 44, 68 y 67), teñido con Hematoxilina y Eosina, donde se observa una lesión moderada donde se observa quistes intraepiteliales e intersticiales, engrosamiento del intersticio (flecha negra) (figura 18).

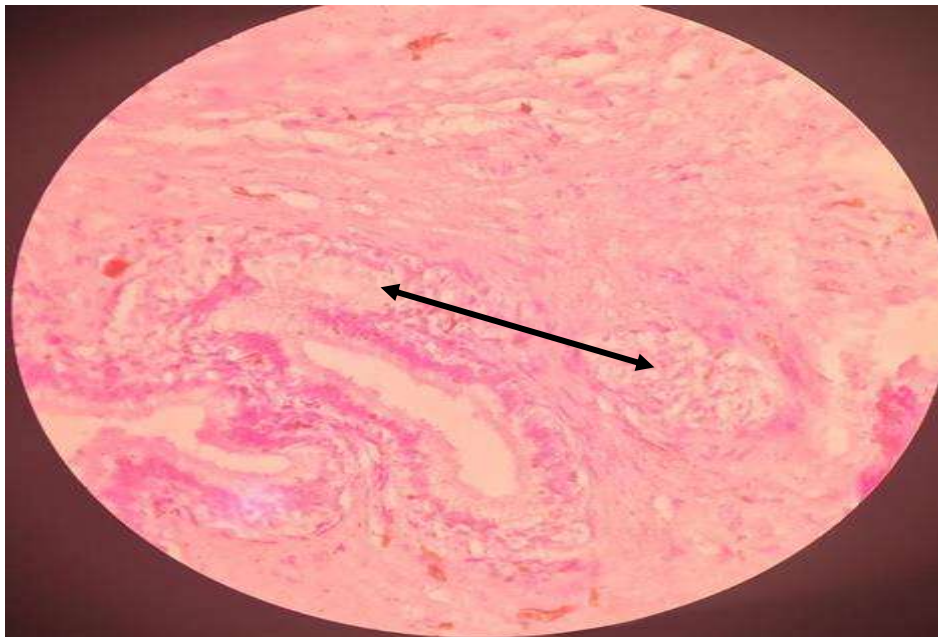


Figura 18. Microfotografía 10x del corte de la cola epidídimo derecho.

Epidídimo derecho de la cola de los carneros que fueron inoculas por mucosa conjuntival y prepucial (37), teñido con Hematoxilina y Eosina, donde se observa una lesión grave, hiperplasia epitelial, fibrosis intersticial (flecha negra) (figura 19).

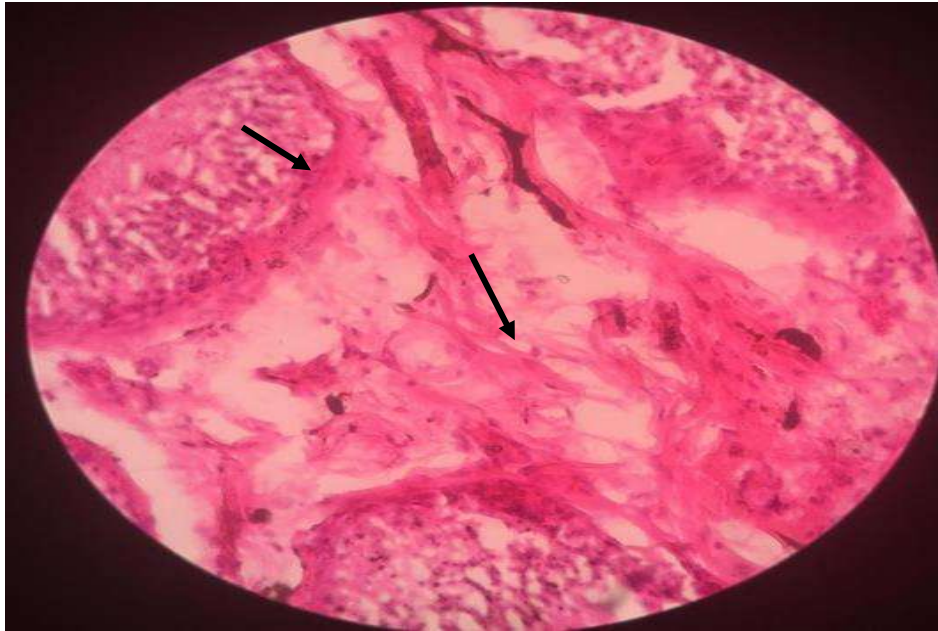


Figura 19. Microfotografía 40x del corte epidídimo derecho cola.

Endometrial izquierdo cabeza de los carneros que fueron inoculas por la mucosa conjuntival y prepucial (39 y 68), y vía intravenosa (45, 38, 50), teñido con Hematoxilina y Eosina, donde se observa una lesión leve de quistes intraepiteliales (flecha negra) (figura 20).



Figura 20. Microfotografía 40x del corte endometrial izquierdo cabeza.

Cabeza del epidídimo izquierdo de los carneros que fueron inoculados por vía intravenosa (37), teñido con Hematoxilina y Eosina, donde se observa una lesión moderada, aumento de células fibrosas a nivel intersticial. (flecha negra) (figura 21).

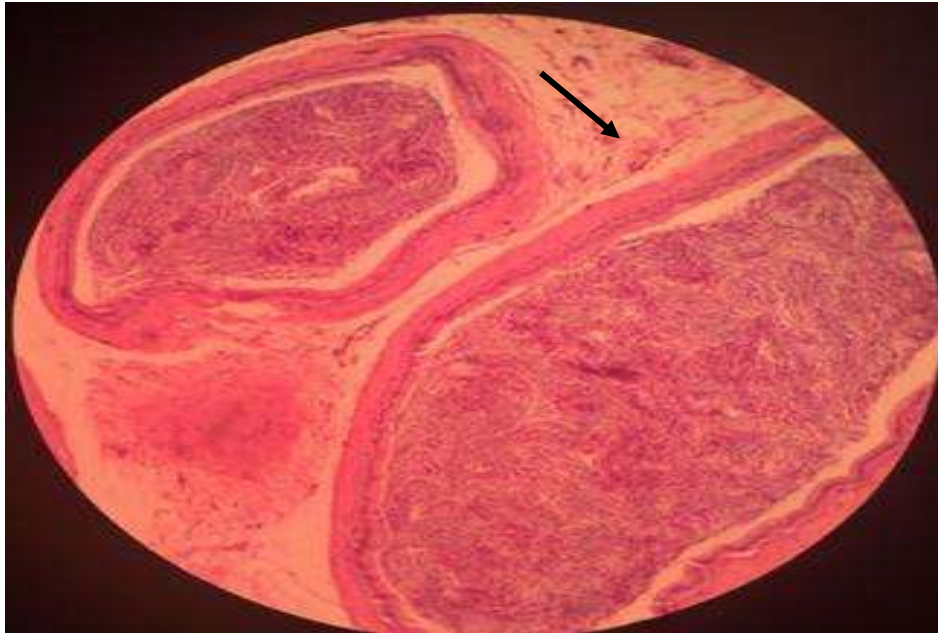


Figura 21. Microfotografía 10x del corte cabeza del epidídimo izquierdo.

Epidídimo izquierdo cabeza de los carneros que fueron inoculados por vía intravenosa (49), teñido con Hematoxilina y Eosina, donde se observa una lesión grave, de granuloma intraespermáticos, con una reacción inflamatoria de tipo granulomatosa, con infiltrados celulares de mononucleares linfocitos histiocitos y fibroblastos. (flecha negra) (figura 22).

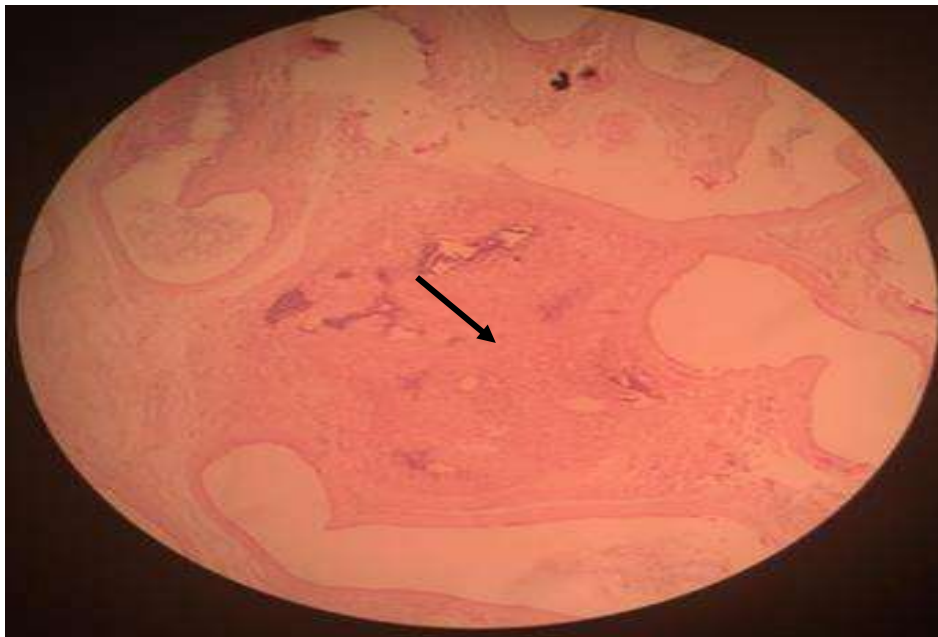


Figura 22. Microfotografía 10x del corte epidídimo izquierdo cabeza.

Cuerpo del epidídimo izquierdo de los carneros que fueron inoculados por la mucosa conjuntival y prepucial (39, 68, 61 y 37), y vía intravenosa (36 y 56), teñido con Hematoxilina y Eosina, donde se observa una lesión leve de quistes intraepiteliales y atrofia de los estereocilios (flecha negra) (figura 23).

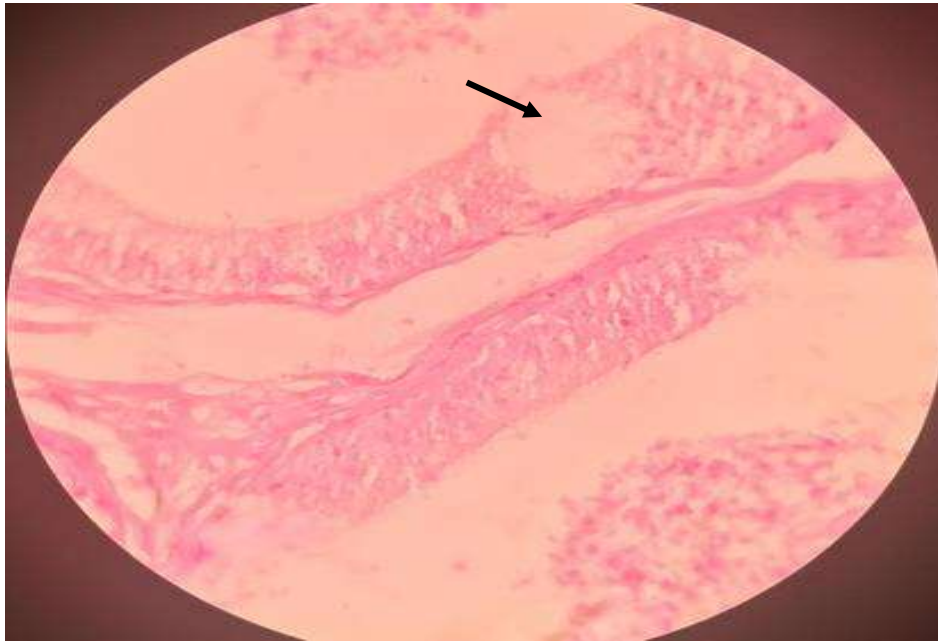


Figura 23. Microfotografía 40x del corte cuerpo del epidídimo izquierdo.

Epidídimo izquierdo que fueron que inoculados por vía intravenosa (45 y 49), teñido con Hematoxilina y Eosina, donde se observa una lesión grave formación de una inflamación de tipo granulomatosa (flecha negra) (figura 24).

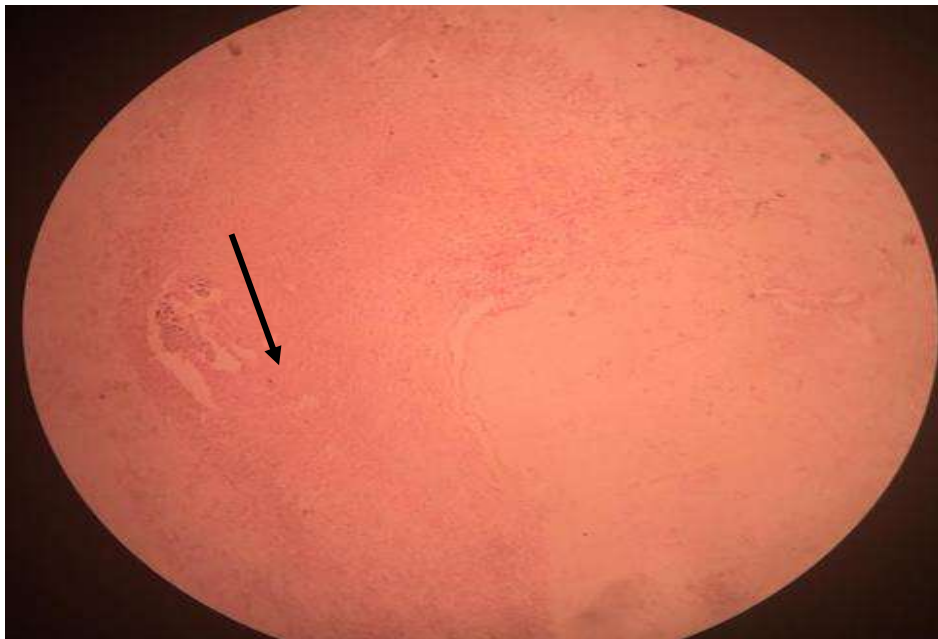


Figura 24. Microfotografía 10x corte del cuerpo del epidídimo izquierdo.

Epidídimo izquierdo los carneros que fueron inoculas por vía intravenosa (36), y la mucosa conjuntival y prepucial (39, 67, 61,39), teñido con Hematoxilina y Eosina, donde se observa una lesión leve, edema intersticial (flecha negra) (figura 25).

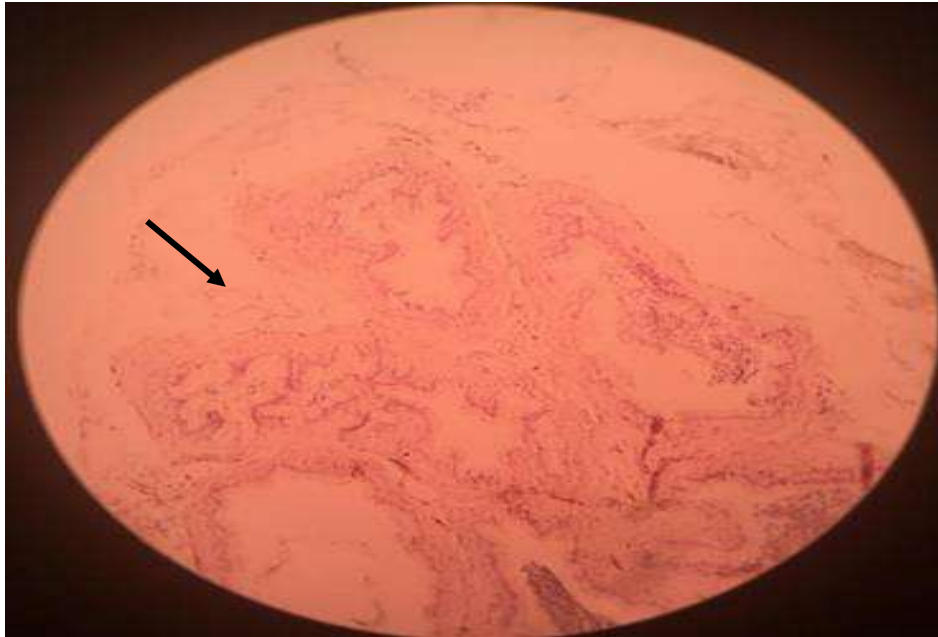


Figura 25. Microfotografía 10x del corte la cola del epidídimo izquierdo.

Epidídimo izquierdo de los carneros que fueron inoculas por vía intravenosa (45, 38 y 56), y la mucosa conjuntival y prepucial (44 y 68), teñido con Hematoxilina y Eosina, donde se observa una lesión moderada, edema intersticial y fibrosis (flecha negra) (figura 26).



Figura 26. Microfotografía 10x del corte cola del epidídimo izquierdo.

Cola del epidídimo izquierdo de los carneros que fueron inoculados por vía intravenosa (49), teñido con Hematoxilina y Eosina, donde se observa una lesión severa. Inflamación de tipo granulomatosa donde se observa la presencia de células globulosas macrófagos, histiocitos linfocitos (flecha negra) (figura 27).

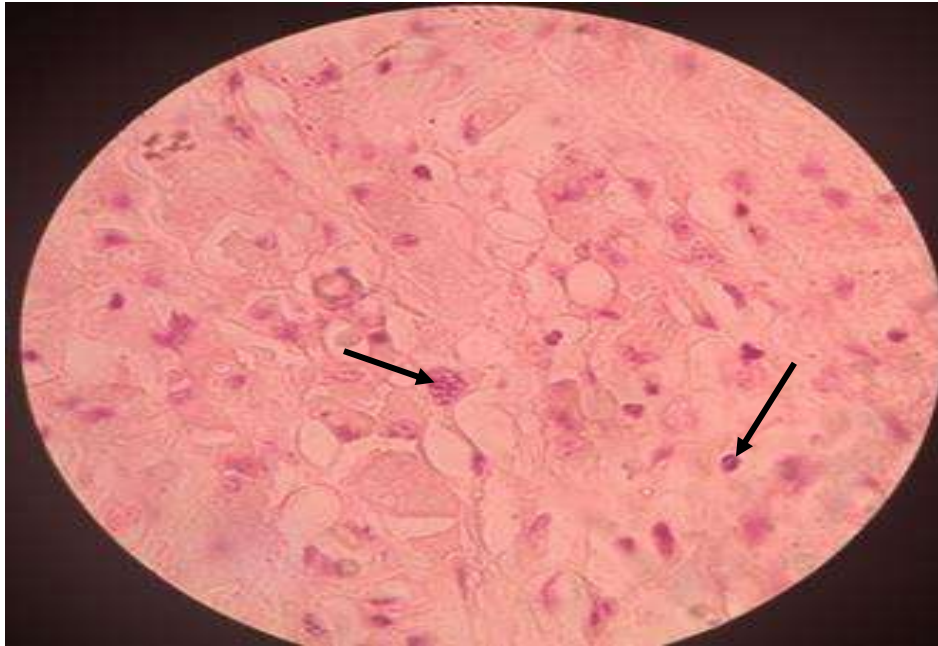


Figura 27. Microfotografía 100x del corte de la cola del epidídimo izquierdo.

Uretra pélvica de los carneros que fueron inoculados por la mucosa conjuntival y prepucial (67 y 37), y vía intravenosa (45, 36, 49, 38, 56 y 50), teñido con Hematoxilina y Eosina, donde se observa una lesión leve escasas vesículas intraepiteliales con descamación epitelial (flecha negra) (figura 28).

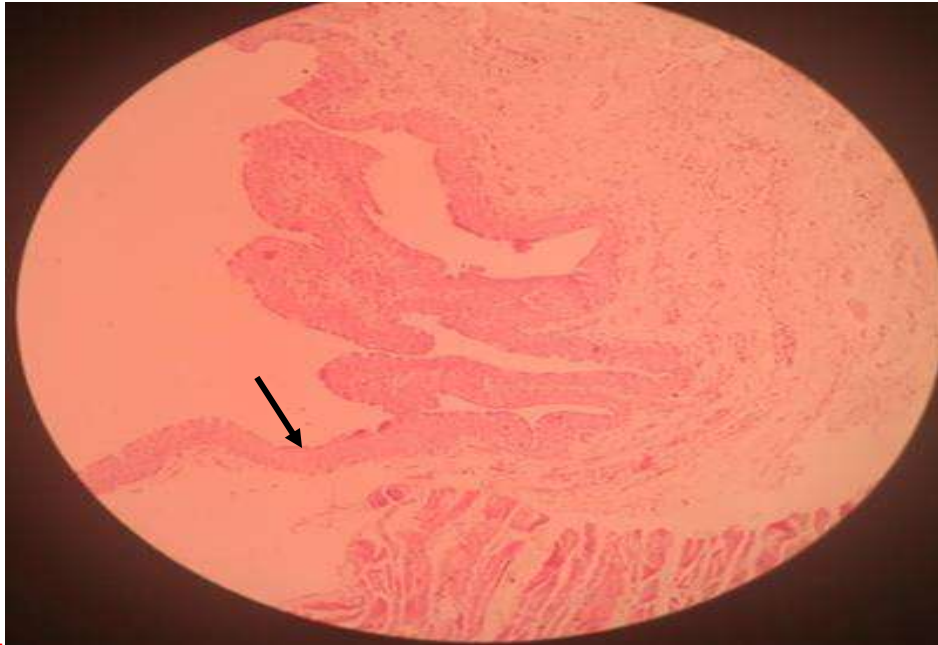


Figura 28. Microfotografía 10 x del corte uretra pélvica.

Tinción BAAR de la cola del epidídimo 100x, en la figura izquierda se observa el fondo azul, se observa artefactos de morfología sospechoso a cocobacilos Ácido alcohol resistente ò BAAR, negativo y la figura de la derecha es una ampliación donde se muestran más definidos los artefactos (flechas negras) (figura 29).

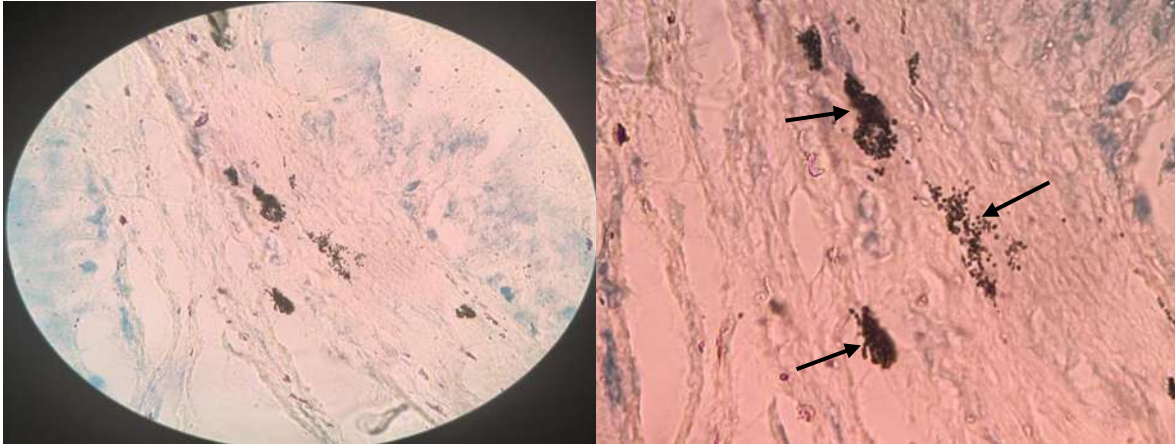


Figura 29. Cola del epidídimo, BAAR.

Tinción Gran de la cola del epidídimo 100x, en la figura de la izquierda se observa el fondo amarillo, núcleos de las células de color rojo; observando artefactos de morfología sospechoso a cocobacilos Gram negativo y en la figura de la derecha es una ampliación donde se muestran los artefactos (flechas negras) (figura 30).

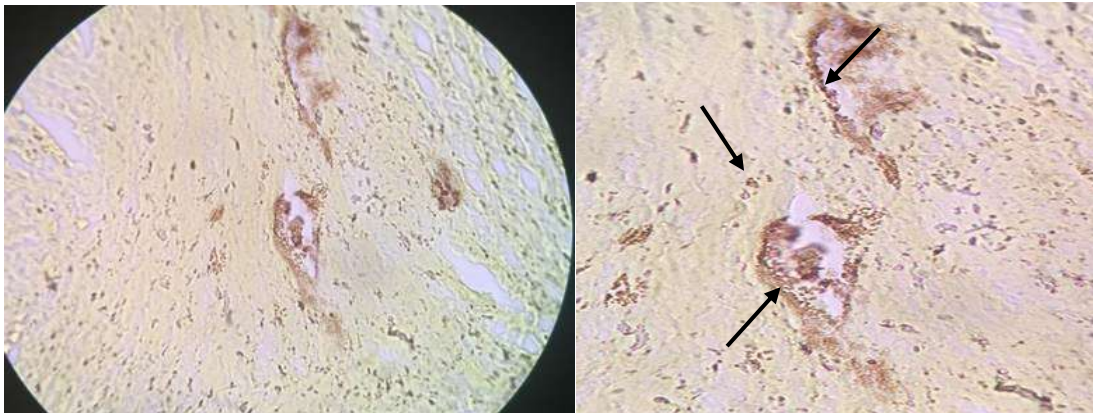


Figura 30. Cola del epidídimo, Gram.