



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“Identificación de *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis*  
e *Histophilus somni* a partir de muestras de semen”

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A  
PMVZ. ISRAEL GUTIERREZ CORTES

Asesores

Dr. Jorge Pablo Acosta Dibarrat  
Dr. Edgardo Soriano Vargas



Toluca, Estado de México, Agosto 2017

## **DEDICATORIAS**

### **A Dios:**

Gracias por todas tus bendiciones para con mi familia y para mi señor, eres mi esperanza desde mi juventud, en ti confío.

### **A Mi Esposa Cindy:**

Por darme todo tú cariño y apoyo, gracias por motivarme día con día para ser mejor, por estar a mi lado y formar parte de mi vida.

### **A Mis Hijas Layla y Annette:**

Ustedes son la mayor inspiración en mi vida, le agradezco infinitamente a Dios por darme la dicha de ser su papá, les dedico mi trabajo con todo mi amor.

### **A Mis Padres:**

Gracias por todo su apoyo incondicional que me brindaron en la vida y especialmente en mi carrera, sin ustedes no lo habría logrado, han sido un gran ejemplo y le doy gracias a Dios por ser mis padres.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **Al Dr. Jorge Pablo Acosta Dibarrat**

Por el apoyo incondicional que me brindó durante todo el trabajo de investigación, por su valioso tiempo invertido, la paciencia que me tuvo para aprender a realizar las pruebas en el laboratorio y compartir sus conocimientos.

### **Al Dr. Edgardo Soriano Vargas**

Por sus valiosas opiniones y sugerencias para la elaboración de esta tesis, al igual que sus conocimientos aplicados y consejos útiles para terminar mi trabajo.

### **Al M. en C. José Luis Gutiérrez Hernández (CENID Microbiología INIFAP)**

Por el suministro de las muestras de semen de casos clínicos y colaboración en la realización del estudio de dichas muestras.

### **A la FMVZ-UAEMex**

Por haberme dado la oportunidad de estar en sus aulas y brindarme el conocimiento y las experiencias necesarias para desarrollar mi profesión.

---

## AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Este trabajo fue financiado en parte por los proyectos:

A) “Situación de la epididimitis ovina en el Estado de México y estandarización de la prueba de PCR múltiple para el diagnóstico de *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* e *Histophilus somni* en semen y órganos reproductivos de carneros”. Proyecto de retención del Dr. Jorge Acosta Dibarrat profesor receptor Dr. Edgardo Soriano Vargas. Financiado por CONACYT mayo 2009 abril 2010.

B) “Evaluación de la respuesta inmune y las alteraciones seminales en la infección experimental con *Brucella ovis*”. Responsable Dr. Jorge Acosta Dibarrat Financiado por PROMEP, UAEM, agosto 2010 a julio 2011.

## RESUMEN

Este trabajo tiene como objetivo identificar los agentes etiológicos más relevantes en la presentación de la epididimitis ovina a través de una prueba de PCR múltiplex. La epididimitis infecciosa en los carneros es considerada una enfermedad de importancia económica, por sus efectos adversos sobre la fertilidad. *Brucella ovis* es reconocido como el agente causal más importante de la epididimitis en carneros, se han acumulado evidencias de la participación de otros microorganismos como *Actinobacillus seminis* y *H. somni*. Se logró la estandarización de la prueba de PCR logrando identificar muestras positivas que contenían como mínimo 4.64 ng/μl de DNA de *B. ovis*, 6.45 ng/μl de *H somni*. Y 7.64 ng/μl de *A. seminis*. Se realizó el estudio en 14 muestras de semen de animales positivos serológicamente para alguno de los agentes detectando 9 positivos para *B. ovis* uno para *A. seminis* y ninguno para *H somni*.

La técnica de PCR multiplex puede ser utilizada con éxito para la detección de las tres bacterias principales causantes de la epididimitis ovina. Igualmente puede ser utilizada como prueba complementaria en el diagnóstico serológico de estas bacterias. La técnica de PCR multiplex es más rápida para obtener en los resultados que los procedimientos de cultivo tradicionales dada la dificultad de aislamiento e identificación de estas bacterias.

**Palabras clave:** Epididimitis, *Actinobacillus seminis*, *Brucella ovis*, *Histophilus somni*, PCR.

## ÍNDICE

DEDICATORIAS.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
RESUMEN.....	v
ÍNDICE DE CUADROS .....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
III. JUSTIFICACIÓN.....	11
IV. HIPÓTESIS .....	12
V. OBJETIVOS .....	13
VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	14
VII. LÍMITE DE ESPACIO .....	25
VIII. LÍMITE DE TIEMPO.....	26
IX. RESULTADOS.....	27
X. DISCUSIÓN.....	40
XI. CONCLUSIONES.....	43
XII. SUGERENCIAS.....	44
XIII.LITERATURA CITADA .....	45
XIV. ANEXOS .....	49

## ÍNDICE DE CUADROS

	Página
<b>CUADRO 1:</b> Iniciadores utilizados en la técnica de PCR Multiplex.....	20
<b>CUADRO 2:</b> Cantidades requeridas de las diferentes soluciones para realizar PCR multiplex.....	27
<b>CUADRO 3:</b> Especificaciones del termociclador requeridas para la PCR multiplex.....	28
<b>CUADRO 4:</b> Cuantificación del DNA de las Diluciones de <i>B. ovis</i> .....	29
<b>CUADRO 5:</b> Cuantificación del DNA de las Diluciones de <i>A. seminis</i> .....	32
<b>CUADRO 6:</b> Cuantificación del DNA de las Diluciones de <i>H. somni</i> .....	34
<b>CUADRO 7:</b> Cuantificación del DNA de <i>Pasteurella multocida</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Mannheimia haemolytica</i> .....	37

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>FIGURA 1:</b> Esquema de la realización de las diluciones.....	21
<b>FIGURA 2:</b> Diseño de la estandarización de la técnica de PCR multiplex.	23
<b>FIGURA 3:</b> PCR multiplex de <i>Brucella ovis</i> , dilución (-1 a -5) .....	30
<b>FIGURA 4:</b> PCR multiplex de <i>Brucella ovis</i> dilución (-6 a -10).....	31
<b>FIGURA 5:</b> PCR multiplex de <i>Actinobacillus seminis</i> dilución (-1 a -5).....	33
<b>FIGURA 6:</b> PCR multiplex de <i>Histophilus somni</i> dilución (-1 a -5).....	35
<b>FIGURA 7:</b> PCR multiplex de <i>Histophilus somni</i> dilución (-6 a -10).....	36
<b>FIGURA 8:</b> PCR multiplex de <i>Pasteurella multocida</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Mannheimia haemolytica</i> .....	38

## I. INTRODUCCIÓN

Los borregos son susceptibles a infecciones bacterianas capaces de localizarse en los órganos genitales, produciendo cuadros clínicos típicos caracterizados por la inflamación notoria del epidídimo (Saunders *et al.*, 2007). Entre estas afecciones, la epididimitis ovina es una enfermedad infecciosa, contagiosa, progresiva e irreversible, de presentación clínica o subclínica, caracterizada por la inflamación del epidídimo, que desencadena en forma secundaria degeneración testicular, y determina finalmente esterilidad del semental (Walker *et al.*, 1986; Appuhamy *et al.*, 1998a). Los principales microorganismos involucrados son *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* e *Histophilus somni*. La epididimitis ovina, ya sea por *B. ovis* u otros agentes, provoca pérdidas económicas graves pero sin muerte de los reproductores, escasos abortos; pero sus consecuencias en la fertilidad de los rebaños puede ser muy importante. Además se debe tener en cuenta la imposibilidad de comercializar estos animales como reproductores. Se debe crear conciencia en los productores de la existencia de esta enfermedad y de los riesgos que implica la compra de reproductores, ya sea en el extranjero o en producciones locales sin realizar los exámenes diagnósticos para *B. ovis* (Genetzky, 1995). El Estado de México concentra alrededor de 800,000 mil cabezas de ganado ovino siendo el primer lugar en existencias ovinas a nivel nacional. Por lo tanto esta entidad se está convirtiendo en uno de los mayores proveedores de pie de cría al nivel nacional. El diagnóstico bacteriológico en semen de estos tres microorganismos resulta muchas veces engorroso por la presencia de bacterias contaminantes del semen o del prepucio que enmascaran el crecimiento de estos microorganismos exigentes y de lento crecimiento. Por lo tanto es necesaria la implementación y estandarización de una prueba de PCR que permita diagnosticar

en forma precisa y rápida la presencia de los mismos y permitirá eliminar portadores antes de que aparezcan lesiones clínicas de epididimitis (Biberstein *et al.*, 1964; Brown *et al.*, 1973). El objetivo del presente trabajo es poner a punto técnicas diagnósticas de avanzada, basadas en PCR utilizadas en países productores de ovinos por excelencia.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### **Antecedentes.**

La epididimitis infecciosa en los carneros es considerada una enfermedad de importancia económica, por sus efectos adversos sobre la fertilidad (Walker *et al.*, 1986; Appuhamy *et al.*, 1998a), disminución en el número de reemplazos disponibles, el uso de un mayor número de carneros por hembra, gastos que ocasiona el mantenimiento de hembras vacías y las restricciones de mercado para los productores que venden sementales ovinos (Genetzky, 1995).

### **Etiología.**

*Brucella ovis* es reconocido como el agente causal más importante de la epididimitis en carneros, en parte por haber sido el primer agente descrito asociado a la enfermedad y por ser el más específico de la misma, su epidemiología y patogenia están ampliamente documentadas (Biberstein *et al.*, 1964; Brown *et al.*, 1973). *B. ovis* es referida como el “microorganismo de la epididimitis del carnero” (Walker *et al.*, 1986; Genetzky, 1995), es una especie rugosa de *Brucella*, lo que debe ser especialmente considerado en el uso diagnóstico de pruebas serológicas y no ha sido demostrada su patogenicidad para el humano. Sin embargo, en el último cuarto de siglo se han acumulado evidencias de la participación de otros microorganismos en los cuadros de epididimitis en carneros, especialmente un grupo de bacilos pleomórficos, Gram negativos, difíciles de aislar e identificar bacteriológicamente, presentes principalmente en lesiones epididimales en borregos jóvenes: *Actinobacillus seminis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Histophilus ovis*, *Haemophilus somnus*, *Haemophilus agni* clasificados actualmente estos tres últimos como *Histophilus somni*. De este grupo de microorganismos *A. seminis* es

el que ha recibido mayor atención y se considera el principal agente etiológico de la epididimitis peripuberal del carnero. La identificación de estos agentes se dificulta debido a la falta de uniformidad en la determinación de sus características bioquímicas o de metabolismo bacteriano *in vitro* y persisten hasta el presente discusiones en cuanto a su taxonomía, relaciones inter especies y diferencias entre cepas (Stephens *et al.*, 1983; Sneath y Stevens, 1990).

Además de *B. ovis* y el grupo de los bacilos pleomórficos Gram negativos, se encuentran implicados en menor grado y generalmente se consideran como invasores secundarios o asociando bacterias tales como: *Actinomyces pyogenes*, *Bacteroides* spp., *Brucella abortus*, *Chlamydomphila psittaci*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Erysipelotrix rhusopathiae*, *Escherichia coli*, *Moraxella* spp., *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas* spp., *Salmonella abortus ovis*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., entre otros (De Long *et al.*, 1979; Walker *et al.*, 1986; Genetzky, 1995).

### **Epidemiología.**

La prevalencia de la epididimitis por *B. ovis* varía entre el 5% y el 100% (Beeman *et al.*, 1982) de los carneros de un rebaño, pero generalmente se encuentra entre el 10% y el 40%. Los estudios serológicos realizados en el altiplano Mexicano mediante la técnica de ELISA demostraron una prevalencia del 22.5% (Méndez *et al.*, 1999).

La epididimitis por *B. ovis* puede pasar desapercibida por la tendencia a tener más carneros de los necesarios en los rebaños, por otra parte los animales con lesiones unilaterales mantienen por periodos prolongados la producción de semen de calidad aceptable. Dado que los abortos son escasos (10%) y afectan a hembras

primerizas, el signo más destacable es la disminución de la fertilidad, con menos de la mitad de las hembras expuestas que llegan a parir.

*A. seminis* puede determinar la pérdida de hasta el 20% de los carneros reproductores durante el primer año de vida, aunque esta pérdida es más baja (Walker *et al.*, 1986). La incidencia encontrada por De Wet y Erasmus (1984), en Sudáfrica, en borregos púberes fue del 5.6%. *A. seminis* ha sido aislado en semen en el 13.8% de carneros que no presentaron lesiones clínicas en el epidídimo, ni en testículo y tampoco neutrófilos en el semen, por lo que se consideró que la infección se encontraba en estado latente, considerándose a estos animales portadores asintomáticos (Van Tonder, 1979a).

En estudios serológicos realizados en México, en los Estados de Hidalgo y México, en 6 explotaciones con un total de 111 carneros, se obtuvo una prevalencia del 9% en pruebas de inmunodifusión, con antígeno soluble de *A. seminis* (Méndez *et al.*, 1999). *Histophilus somni* fue descrito por primera vez en muestras de semen de borregos con epididimitis en México en el año 2005 utilizando la técnica de PCR (Palomares *et al.*, 2005).

Bulgin y Anderson (1983) consideran dos cuadros de epididimitis, uno en animales adultos en el cual el agente más frecuente es *B. ovis* y otro en animales vírgenes, púberes, provocado por bacilos pleomórficos Gram negativos, en el que incluyen a *B. ovis*, *A. seminis* y los demás *Actinobacillus* y *Haemophilus*. Por lo tanto se caracterizan dos diferentes entidades patológicas, dependiendo de la actividad sexual del individuo. En el mismo sentido, estudios de prevalencia realizados en EE.UU., indican que *B. ovis* fue aislado comúnmente en carneros pertenecientes a rebaños generales, en cambio se encontró mayor prevalencia de bacilos pleomórficos Gram negativos, en carneros vírgenes de rebaños para pie de cría, concluyendo que se trata de dos entidades patológicas, con diferentes agentes

etiológicos, se presentan bajo diferentes condiciones de manejo, posiblemente influidas por distintos factores predisponentes (Bagley *et al.*, 1985). Si bien esta es la presentación característica de la enfermedad, estas diferencias no son estrictas y ocurren casos de epididimitis por *B. ovis* en borregos púberes y por *A. seminis* en carneros adultos.

### **Diagnóstico.**

#### **Diagnóstico bacteriológico.**

Jansen (1983) y Searson (1982) encontraron gran variedad de bacterias en el aparato reproductor de borregos provenientes de distintos establecimientos, sin la presencia de cambios patológicos a la palpación de los órganos genitales, ni de células inflamatorias en el semen. En un estudio realizado, se encontró una gran variedad de bacterias en el tracto reproductor de los animales infectados experimentalmente con *A. seminis*, coincidentes o no con la presencia de escasos exudados inflamatorios y/o infiltración de mononucleares en las glándulas anexas, que sugiere la existencia de una flora saprófita en el tracto reproductivo (Acosta-Dibarrat, 2001).

*B. ovis* cocobacilo Gram negativo pequeño de 0.7 a 1.2 $\mu$ m de largo por 0.3 a 0.7 $\mu$ m de ancho, que se desarrolla en agar sangre o agar *Brucella* enriquecidos con 5 a 10% de sangre de ovino y en condiciones microaerófilas (5 al 10% de CO<sub>2</sub>), para su diagnóstico se requiere del medio selectivo de Thayer-Martin (Brown *et al.*, 1971) que facilita su aislamiento a partir de muestras seminales que suelen contener un número elevado de contaminantes, que pueden enmascarar las colonias de *B. ovis* por su pequeño tamaño y de lento crecimiento.

*B. ovis* produce colonias rugosas, no es hemolítica, es positiva a la prueba de la acriflavina, ureasa negativa, no reduce nitratos a nitritos es catalasa y oxidasa

negativa, no produce ácido sulfhídrico, no desarrolla en presencia de azul de metileno y habitualmente crece en concentraciones estándar de fucsina básica y treonina. Se puede aplicar el lisodiagnóstico para diferenciar *B. ovis* de las otras especies del género, para lo cual se utilizan por bacteriófagos Tb, Wb, Iz y R/C, para los tres primeros la prueba es negativa y para el último es positiva, en todos los casos utilizando la dilución corriente de prueba (Marín y Blasco, 2001).

*B. ovis* puede ser recuperada de los epidídimos, ámpula deferente, vesícula seminal, nódulos linfáticos inguinales, hígado, riñones y bazo (Biberstein *et al.*, 1964; Plant *et al.*, 1986) y en las hembras del útero y nódulos linfáticos ilíaco y supramamario. Cuando se producen abortos la placenta debe ser examinada así como los fetos abortados, en los cuales el sitio de preferencia para realizar cultivos es el contenido abomasal y pulmones fetales (Hughes, 1972), en estos casos se puede aislar la bacteria a partir de la leche o de lavados vaginales (Grilló *et al.*, 1999).

*A. seminis* se describe como un bacilo pleomórfico, Gram negativo, de 1  $\mu\text{m}$  x 1-4  $\mu\text{m}$ , inmóvil y sin presencia de endoesporas, cápsula, ni pilis. El crecimiento óptimo ocurre cuando es incubado en una atmósfera de 10% de CO<sub>2</sub> y 37°C de temperatura, su crecimiento se ve favorecido con el agregado de sangre o suero. Luego de 24 horas se observan las colonias del tamaño de una cabeza de alfiler, a las 48 horas alcanzan un diámetro de 1-2 mm, a los cuatro días adquieren un diámetro mayor de 3 mm de color gris blanquecino, *A. seminis* es generalmente catalasa positivo y oxidasa negativo, indol negativo y no fermenta la glucosa. No se desarrollan en agar MacConkey (Swanepoel, 1984). La mayoría de las cepas no reducen nitratos a nitritos, pero puede ocurrir ocasionalmente (Van Tonder, 1979b). No producen hemólisis (Cousins y Lloyd, 1988), sin embargo algunas cepas presentan hemólisis incompleta (Swanepoel, 1984). La producción de ácido

sulfhídrico detectado en tira de papel impregnado con acetato de plomo es negativa, pero pueden ocurrir reacciones leves.

Dada la similitud existente entre *A. seminis* y las bacterias del grupo *Haemophilus-Histophilus* (H-H) actualmente *Histophilus somni*, tanto por morfología como por su actividad metabólica es necesario recurrir a técnicas de biología molecular para poder realizar una distinción clara.

En estudios de perfiles de proteínas de membrana externa por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) se encontró homogeneidad en las bandas de *A. seminis* (ATCC 15768) y un aislamiento de campo realizado en Australia, permitiendo la diferenciación con *H. somnus*, *H. ovis* e *H. agni* (Stephens *et al.*, 1983). Los estudios con enzimas de restricción (*Bam*HI), permiten realizar la diferenciación de *A. seminis* con el grupo H-H y también con *A. lignierensii* (Mc Gillivery y Webber, 1989).

Appuhamy *et al.* (1998b) desarrolló un PCR específico para *A. seminis*, diseñando iniciadores que amplifican una región del gene *rrnB* que es uno de los dos operones ribosomales caracterizados, que codifica para dos RNA de transferencia (tRNA-Ile y tRNA-Ala). Lo destacable de este diseño es que el PCR amplifica una banda única de 436 pb y no da productos de amplificación para *H. ovis*, *H. somnus*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. multocida*, *P. haemolytica* ni *E. coli* que son bacterias comúnmente aisladas del aparato reproductor de ovinos y bovinos.

Se ha desarrollado la técnica de inmunofluorescencia para la detección de *A. seminis* y *B. ovis* en semen (Ajai *et al.*, 1980).

### **Diagnóstico serológico.**

En el diagnóstico de *B. ovis* se han aplicado varios métodos serológicos: fijación de complemento (FC) (Biberstein *et al.*, 1962), hemaglutinación indirecta (HAI), inmunodifusión en gel (IDD) y ensayo inmunoenzimático ELISA, sin embargo, con ninguno de ellos se logran resultados concluyentes, pues son frecuentes los falsos negativos y se ha señalado que esta situación no depende de la sensibilidad de la técnica empleada. Así se da el caso de que en una muestra de suero se detectan anticuerpos con la técnica de IDD y resultan negativos los intentos con FC o ELISA (Worthington *et al.*, 1985). Trabajos más recientes utilizan como antígeno el extracto salino caliente (Marín *et al.*, 1989) en FC, IDD (Ficapal *et al.*, 1998) o ELISA (Méndez *et al.*, 1999), que contiene lipopolisacárido rugoso (R-LPS), proteínas de membrana externa del grupo 3 y componentes de membrana externa. Esta presentación antigénica posee determinantes específicos para *B. ovis*, pero también presenta componentes que pueden determinar reacción cruzada con *B. melitensis*, otras *Brucellas* o la cepa Rev I de *B. melitensis* (Santos *et al.*, 1984; Riezu-Boj *et al.*, 1986). Para reducir errores diagnósticos, es recomendable realizar más de un estudio serológico separados en tiempo y aplicar en cada caso más de una técnica.

Los sueros de animales infectados experimentalmente por inoculación intraepididimal con *A. seminis*, presentan anticuerpos detectables por FC a los 14 días pos infección, con una persistencia de 35 días. También se encontró que los animales de los cuales se aisló *A. seminis* del semen, no presentaban títulos detectables por FC (Baynes y Simmons, 1960).

La prueba de IDD para *A. seminis*, muestra reacciones cruzadas por la presencia de antígenos comunes con los integrantes del grupo *Haemophilus-Histophilus* (Stephens *et al.*, 1983).

Se han desarrollado pruebas de ELISA utilizando antígenos de *A. seminis* completo y sonificado (Cardenas y Maki, 1986; Acosta Dibarrat, 2007) y empleando como antígeno el LPS preparado en autoclave y centrifugación (Tekes y Hajtos, 1990).

### III. JUSTIFICACIÓN

La identificación de los principales agentes causantes de la epididimitis de los carneros a través de una prueba de PCR múltiple contribuirá en el diagnóstico rápido y certero de las tres bacterias principales (*Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* e *Histophilus somni*). Dado que las mismas son bacilos pleomórficos Gram negativos cuyo diagnóstico por cultivo bacteriológico se hace difícil, ya que su comportamiento en las bioquímicas es variable según las cepas. Además en el caso de *B. ovis* es una bacteria de crecimiento lento y exigente lo cual retarda el diagnóstico bacteriológico de rutina. Por lo tanto el establecer una técnica de PCR múltiple acortará los tiempos y será una herramienta más para los productores que se dedican a la congelación y venta de semen, para garantizar la sanidad del mismo.

#### **IV. HIPÓTESIS**

Las bacterias *B. ovis*, *A. seminis* e *H. somni*, principales agentes causantes de epididimitis, pueden ser identificados mediante una técnica de PCR múltiple.

## **V. OBJETIVOS**

### **Objetivo General.**

Identificar los agentes etiológicos más relevantes en la presentación de la epididimitis ovina a través de una prueba de PCR múltiple.

### **Objetivos Específicos.**

1. Realizar la extracción de DNA de muestras de semen contaminadas con los diferentes agentes a estudiar.
2. Estandarizar y optimizar la técnica de PCR múltiple.
3. Determinar la sensibilidad de la prueba de PCR múltiple.
4. Determinar la especificidad de la prueba de PCR múltiple
5. Correlacionar la seropositividad y el PCR múltiple a partir de muestras clínicas obtenidas en campo.

## VI. MATERIAL Y MÉTODOS

### MATERIAL

#### 1- Muestras de semen:

- a) Muestras de semen de reproductores en campo.
- b) Muestras de semen congelado.
- c) Muestras de semen de animales inoculados experimentalmente con *Brucella ovis*.
- d) Electroeyaculador.
- e) Bolsas y tubos para la recolección del semen.

#### 2- Bacteriología de las muestras de semen:

- a) Cajas de Petri.
- b) Agar sangre al 5%.
- c) Estufa Bacteriológica.
- d) API-20E para la identificación bacteriológica.

#### 3- Extracción de DNA:

- a) Kit para extracción de DNA (DNeasy Blood and Tissue Kit) Laboratorio Quiagen.
- b) Nano Drop. Para cuantificar DNA.
- c) Centrífuga para viales de 1.5 ml.

#### 4- Conteo de DNA:

- a) Equipo Quawell UV-Vis Spectrophotometer Q5000.
- b) Computadora.
- c) ALN (limpiador).
- d) Micropipeta-Puntas.
- e) Paño para limpieza.
- f) Buffer AE.
- g) Guantes.

#### 5- Pruebas de PCR:

- a) Iniciadores para amplificar sectores del DNA de *Histophilus somni*, *Actinobacillus seminis*, *Brucella ovis*.
- b) Kit de PCR Múltiplex, Laboratorios Quiagen.
- c) Termociclador.
- d) Agarosa.
- e) Marcador de peso molecular.
- f) Cámara de Electroforesis horizontal.
- g) Transiluminador.
- h) Foto-documentador.

#### 6- Cepas de referencia:

- a) *Brucella ovis*: REO 198.
- b) *Actinobacillus seminis*: ATCC 15768.
- c) *Histophilus somni*: ATCC 2336.

## MÉTODO

Se realizaron muestreos en los borregos de productores interesados y de animales con inoculación experimental de *B. ovis*.

En el momento de los muestreos se realizó la anamnesis del establecimiento y se procedió a realizar examen clínico de todos los machos reproductores y extracción de semen y sangre para realizar estudios bacteriológicos y serológicos.

### 1.- Examen clínico.

En el momento de la extracción de semen, se procedió a realizar el examen clínico del aparato genital, describiendo las posibles lesiones y su ubicación en el testículo y en el epidídimo. Se clasificarán en grados de lesión, desde una cruz a cuatro cruces, según el tamaño y simetría de las colas y cabezas del epidídimo, existencia de alteraciones en la superficie epididimal o en la consistencia y el tamaño testicular y/o dificultad en el desplazamiento del testículo y epidídimo en el escroto (Acosta-Dibarrat *et al.*, 2006).

### 2.- Extracción de semen.

La extracción del semen se realizó con electroeyaculador (transformador 12 VCT, 500 mA) previo lavado prepucial con agua estéril conteniendo 0.1% de cloruro de benzalconio y posterior secado con algodón estéril (van Tonder, 1979a).

La técnica de electroeyaculación se basó en la descrita por Hafez (1993). Se sujetó al animal en decúbito lateral, se extrajo el pene y se mantuvo exteriorizado sostenido por una gasa colocada detrás del glande. Luego se introdujo el vástago lubricado con vaselina en el recto, aproximadamente 15 cm y se realizaron movimientos de masaje, los cuales consistieron en introducir y sacar el vástago ejerciendo presión

sobre el piso de la pelvis. Se aplicaron pulsos de 5 segundos, aumentando el voltaje, entre pulso y pulso se dejó un tiempo de descanso de 10 segundos.

El semen se recogió en bolsa estéril, se conservó y transportó al laboratorio en refrigeración, realizando de inmediato el frótis y la siembra.

### **3.- Análisis bacteriológico.**

#### **3.1- Semen.**

Para el examen bacteriológico de las muestras de semen se utilizó medio base de agar con 10% de sangre ovina. La incubación de las muestras se realizó en una atmósfera con 10% de CO<sub>2</sub> y en condiciones aeróbicas hasta por 7 días, dependiendo del desarrollo bacteriano (Simmons *et al.*, 1966; Heath *et al.*, 1991).

La identificación definitiva en caso de sospecha de *B. ovis*, *A. seminis* o *H. somni* se realizó por PCR-Multiplex, para lo cual se realizó la extracción del ADN. Se utilizará y modificará la técnica descrita por (Saunders *et al.*, 2007).

### **4.- Diagnóstico de *A. seminis*, *H. somni* y *B. ovis* por PCR múltiple en muestras seminales.**

#### **4.1- Protocolo de la extracción de DNA.**

De acuerdo al protocolo del Kit (DNeasy Blood and Tissue, Quiagen). Para extracción de DNA de Bacterias Gram negativas.

##### **4.1.1- Pretratamiento para bacterias Gram Negativas.**

1. Cosechar las células (máximo  $2 \times 10^9$  células) en un tubo de microcentrífuga. Centrifugar por 10 minutos a 7500 rpm y descartar el sobrenadante.
2. Resuspender el pellet en 180 µl de buffer ALT. Protocolo de purificación de DNA total de Tejidos Animales (Spin Column Protocol).

3. Adicionar 20 µl de proteinasa K y mezclar en el vortex. Incubar a 56°C por 1-3 horas hasta que el tejido este completamente lisado, se puede mezclar en el vortex ocasionalmente durante la incubación. Se debe obtener una consistencia viscosa, no gelatinosa.
4. Se mezcla en el vortex por 15 segundos. Adicionar 200 µl de buffer AL a la muestra y se mezcla nuevamente con ayuda del vortex. Adicionar 200 µl de etanol (96-100%) y se mezcla en el vortex (El buffer AL y el etanol pueden ser premezclados antes de adicionarse a la muestra).
5. Del tubo de microcentrífuga (Eppendorf) se pipetea la muestra incluyendo cualquier precipitado al DNeasy Mini Spin con su tubo colector. Centrifugar a 8000 rpm durante un minuto. Se descarta el tubo colector.
6. Se coloca un nuevo tubo colector. Adicionar 500 µl de buffer AW1 al DNeasy Mini Spin. Centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm. Nuevamente se descarta el tubo colector.
7. Se coloca un nuevo tubo colector. Adicionar 500 µl de buffer AW2 al DNeasy Mini Spin. Centrifugar durante 3 minutos a 14 000 rpm. Nuevamente se descarta el tubo colector.
8. Colocar el DNeasy Mini Spin Column en un tubo de microcentrífuga (Eppendorf) de 1.5-2 ml. Pipetear 100 µl de buffer AE directo en la DNeasy membrana. Incubar a temperatura ambiente durante un minuto. Centrifugar por un minuto a 8000 rpm para extraer el DNA.
9. Repetir el paso 8.

#### **4.2- Cuantificación del DNA.**

Para realizar la cuantificación del DNA se utilizó el equipo Quawell UV-Vis Spectrophotometer con el programa Q5000 instalado en la computadora del laboratorio. Se selecciona el programa para cuantificación de ácidos nucleicos (DNA).

Previo a cada determinación se limpia el espectrofotómetro con solución ALN. Posteriormente se colocan 2 µl de la muestra en buffer AE, y se leen los resultados que arroja el programa.

#### **4.3- Cepas Utilizadas.**

*Brucella ovis* (REO 198), *Actinobacillus seminis* (ATCC 15768) e *Histophilus somni* (ATCC 2336) fueron cultivadas en condiciones microaerófilas (velobiosis) en agar sangre ovina al 5%. *A. seminis* y *H. somni* crecieron a las 24 horas, mientras que *B. ovis* creció a las 72 horas.

#### **4.4- Estandarización de la técnica PCR para identificación de *A. seminis*, *B. ovis* e *H. somni*.**

El proceso del PCR-Multiplex se basó en el trabajo realizado por Saunders *et al.* (2007). Las secuencias de los iniciadores y tamaños de los productos de amplificación se describen en el Cuadro 1. El PCR Multiplex se realizó utilizando un Kit comercial (Quiagen). Se estandarizaron las concentraciones óptimas de primers, DNA para la realización de las corridas de PCR partiendo de los protocolos de Saunders *et al* 2007. Los productos del PCR se corrieron en geles de agarosa en cámara de electroforesis horizontal y fueron foto documentados.

**CUADRO 1:**

**Iniciadores utilizados en la técnica de PCR Multiplex.**

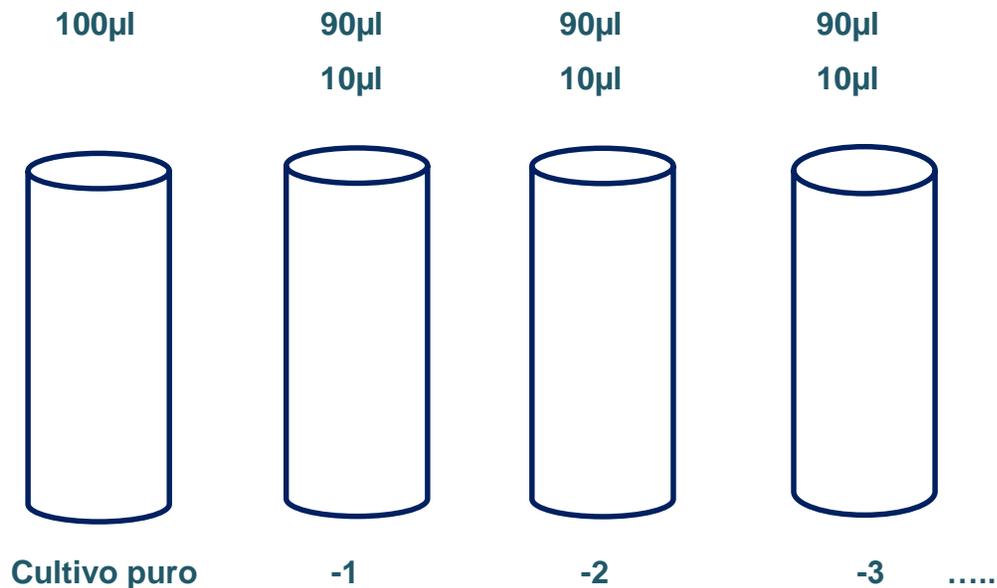
Especie	Primer	Secuencia del primer (5' – 3')	Tamaño del producto (bp)
<i>B. ovis</i>	ISP1	GGTTGTTAAAGGAGAACAGC	690
	ISP2	GACGATAGCGTTTCAACTTG	
<i>A. seminis</i>	SRJAS1	CTTATCTTTCTTAAGCCCTGAC	436
	SRJAS2	AAGAAAAAGACGAAGAGACATT	
<i>H. somni</i>	HS 453-F	GAAGGCGATTAGTTTAAGAG	313
	HS 765-R	ACTCGAGCGTCAGTATCTTC	

**4.4.1 Estandarización de la técnica de PCR Multiplex: determinación de la sensibilidad.**

Partiendo de los cultivos puros de cada cepa se tomó una colonia la cual se diluyó en 100 µl de buffer AE de esta primera dilución se realizaron hasta 10 diluciones en base 10. Para lo cual se tomaron 10 µl de la primera dilución y se colocaban en 90 µl de buffer se agitaba con vortex y se procedió a la próxima dilución.

**FIGURA 1:**

**Esquema de la realización de las diluciones.**



Posteriormente se extrajo DNA de cada dilución y se cuantificó y se realizó el PCR según lo indicado en los puntos (4.1, 4.2 y 4.4).

**4.4.2 Procedimiento para realizar la PCR Multiplex.**

1.- El material a utilizar deberá ser nuevo, limpio y estéril (puntas y tubos Eppendorf) y las micropipetas a utilizar deberán ser exclusivamente para PCR. Es indispensable el uso de guantes de látex durante todo el proceso.

2.- Deberá limpiarse el área de trabajo con etanol al 70% antes y después del proceso para evitar contaminación.

3.- Mezclar los componentes para la PCR en un Eppendorf (tubo para microcentrífuga) de 1.5 ml excepto las muestras problema y conservar la muestra con el tubo tapado; es recomendable calcular sobre el número de muestras a procesar un control positivo y uno negativo, además de uno o dos volúmenes más para evitar faltantes por pérdidas por residuos en puntas de micropipetas. Deberá utilizarse una punta para Micropipeta por cada componente de la mezcla para evitar la contaminación del kit.

4.- Colocar 49 µl de la mezcla en cada tubo Eppendorf de 200 µl y 1 µl de muestra (utilizar puntas nuevas por cada muestra), es importante tapar adecuadamente los tubos y asegurarse de que no existan burbujas en la mezcla, de ser así, se recomienda dar un spin a la muestra en la microcentrífuga.

5.- Colocar las muestras en el termociclador con las especificaciones que muestra el cuadro 3.

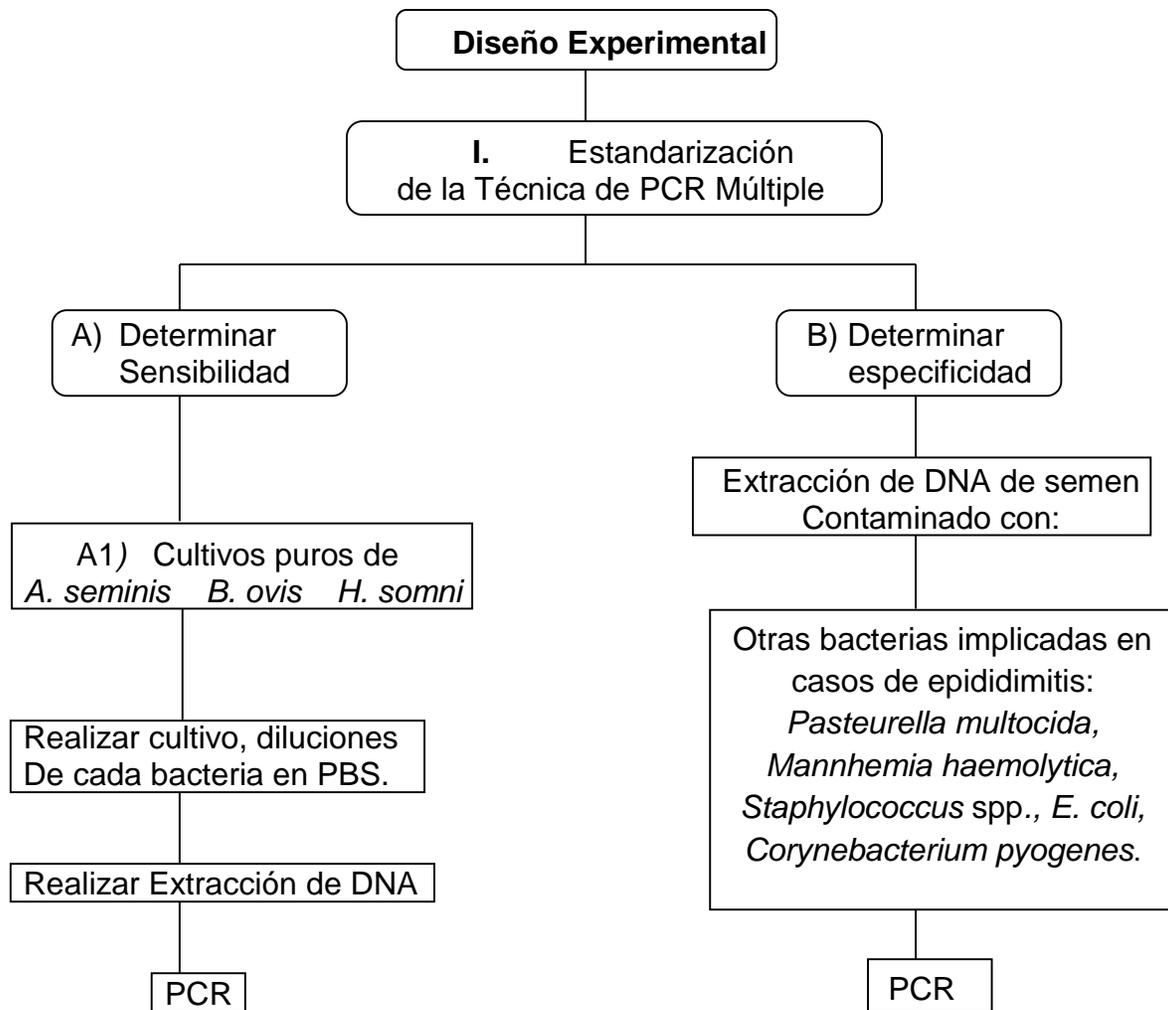
#### **4.4.3 Estandarización de la técnica de PCR Múltiple: determinación de la especificidad**

Para determinar la especificidad se tomaron 5 géneros bacterianos que pueden estar relacionadas con la presentación de epididimitis en carneros.

Las bacterias utilizadas fueron: *Pasteurella multocida*, *Brucella ovis* (aislamiento de Zacatecas), *Mannheimia haemolytica*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

FIGURA 2:

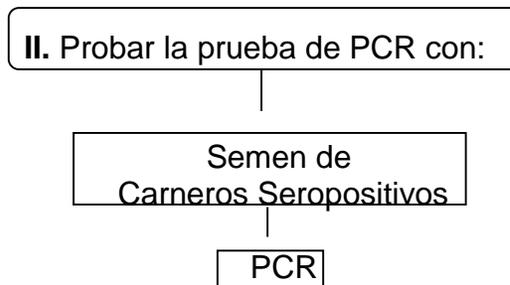
Diseño de la estandarización de la técnica de PCR multiplex



#### 4.4.4. Prueba de PCR con muestras de campo

Se utilizó la PCR múltiple para la detección del ADN de *B. ovis*, *A. seminis* y/o *H. somni* en las muestras de semen que provinieran de carneros IDGA positivos a cualquiera de las tres bacterias.

Se utilizaron 14 muestras de semen colectadas provenientes de animales seropositivos a *B. ovis* proporcionadas por el M en C José Luis Gutiérrez Hernández resultados publicados en (Gutiérrez-Hernández, *et al.*, 2015) estas se emplearon para confirmar el diagnóstico de infección de esta bacteria mediante PCR múltiple y se buscó detectar la asociación de otras bacterias como *A. seminis* e *H. somni*. En 9 de las 14 muestras se logró amplificar el ADN de *B. ovis* una de estas 9 también se demostró la presencia de ADN de *A. seminis* a pesar de que en el análisis serológico no se detectaron anticuerpos contra esta bacteria. Ninguna muestra de semen resultó positiva a *H. somni*.



## **VII. LÍMITE DE ESPACIO**

El presente estudio se realizó en las instalaciones del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México. En las mismas se encuentra un laboratorio de Bacteriología y uno de Biología Molecular, el laboratorio de bacteriología cuenta con estufa, autoclave, centrifugas, refrigeradores; El laboratorio de Biología Molecular cuenta con termociclador, cámaras horizontales para corrimiento de geles y fotodocumentador.

### VIII. LÍMITE DE TIEMPO

	Agosto 2016	Septiembre 2016	Octubre 2016	Noviembre 2016	Diciembre 2016	Enero 2017
Revisión bibliográfica.						
Obtención de muestras de campo, de inoculación experimental y de semen congelado.						
Realización de la extracción de DNA de Bacterias y de semen contaminado.						
Estandarización de la técnica de PCR y pruebas de campo.						
Escritura de la tesis.						

## IX. RESULTADOS

### ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA

Se realizó la estandarización de la prueba de PCR Múltiple con las siguientes especificaciones, soluciones y temperaturas requeridas.

#### CUADRO 2:

**Cantidades requeridas de las diferentes soluciones para realizar PCR multiplex.**

	Volumen	4 muestras*	10 muestras*
Mix PCR	25 µl	100 µl	250 µl
Solución Q	5 µl	20 µl	50 µl
Primers	6 µl (1 µl/ primers)	24 µl	60 µl
H2O para PCR	13 µl	52 µl	130 µl
Muestra problema	1 µl	--	--
Volumen final	50 µl	196 µl/4 muestras=49 µl	490µl/10muestras=49 µl

\*Ejemplo de los volúmenes de cada uno de los componentes de la reacción de PCR para procesar 4 muestras y 10 muestras

**CUADRO 3:**

**Especificaciones del termociclador requeridas para la PCR multiplex.**

<b>Procedimiento</b>	<b>Temperatura y tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturalización inicial	96°C durante 10 min.	---
Desnaturalización	94°C durante 30 s.	
Alineamiento	57°C durante 60 s.	35
Extensión	72°C durante 30 s.	
Extensión final	72°C durante 6 min.	--
Conservación	4°C ∞	--

## PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

La estandarización de la técnica de PCR la describimos en los anexos 1 y 2 respectivamente. Los resultados obtenidos de la cuantificación del DNA son los siguientes.

### Sensibilidad de *Brucella ovis*.

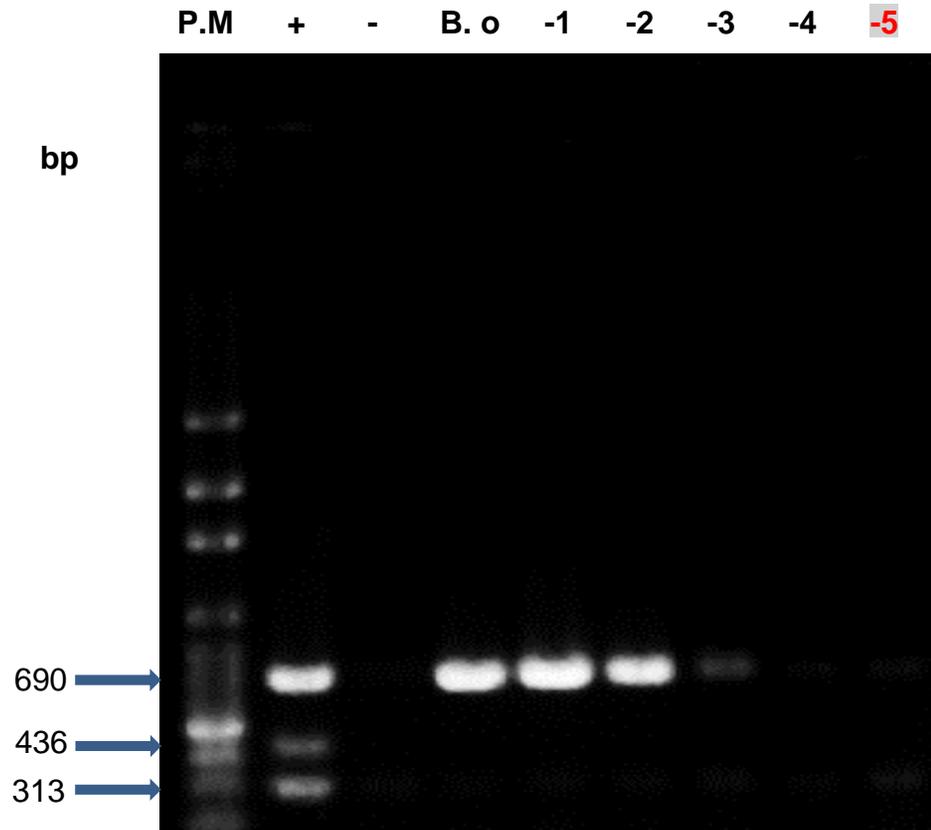
#### CUADRO 4:

#### Cuantificación del DNA de las Diluciones de *B. ovis*.

	Dilución	ng/ $\mu$ l
<i>Brucella ovis</i>	--	13.2
<i>Brucella ovis</i>	-1	8.1
<i>Brucella ovis</i>	-2	6.04
<i>Brucella ovis</i>	-3	5.05
<i>Brucella ovis</i>	-4	4.8
<b><i>Brucella ovis</i></b>	<b>-5</b>	<b>4.64</b>
<i>Brucella ovis</i>	-6	4.15
<i>Brucella ovis</i>	-7	4.15
<i>Brucella ovis</i>	-8	3.74
<i>Brucella ovis</i>	-9	2.69
<i>Brucella ovis</i>	-10	1.2

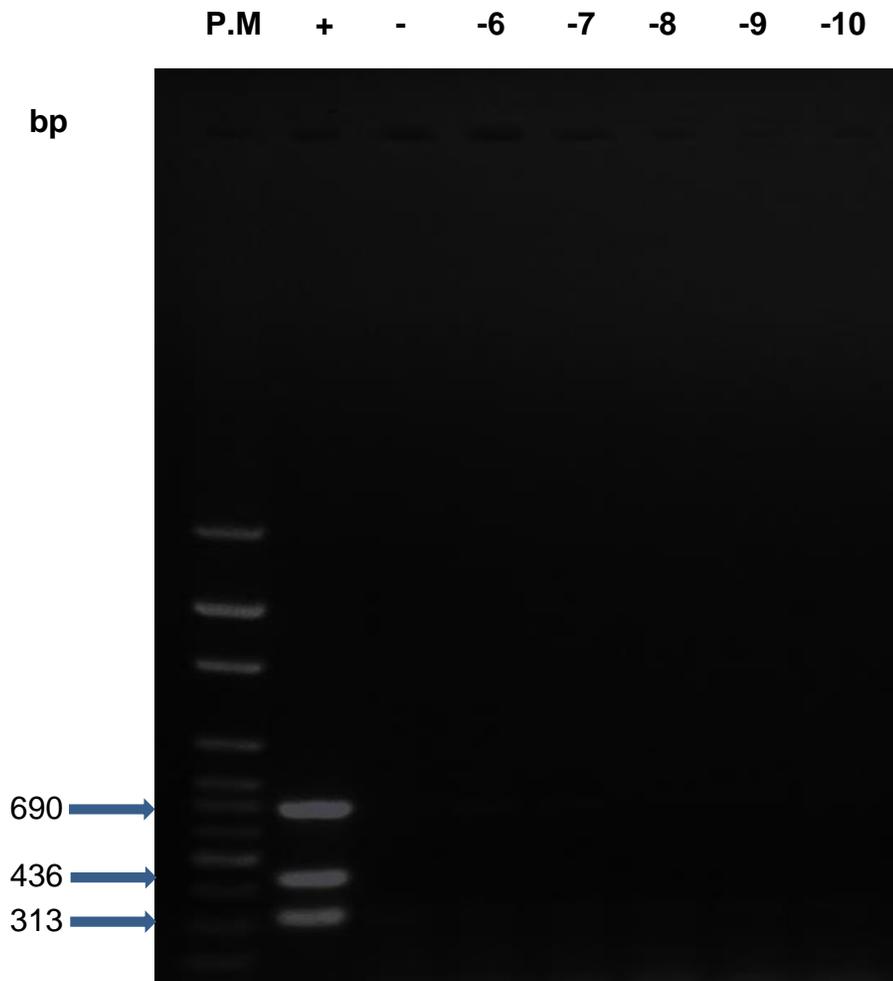
**FIGURA 3:**

PCR multiplex de *Brucella ovis*, dilución (-1 a -5).



**FIGURA 4:**

**PCR multiplex de *Brucella ovis* dilución (-6 a -10).**



Nuestra técnica de PCR multiplex para *Brucella ovis* detecta hasta 4.64 ng/μl de DNA, en la dilución a la -5 como se muestra en las figuras.

**Sensibilidad de *Actinobacillus seminis*.**

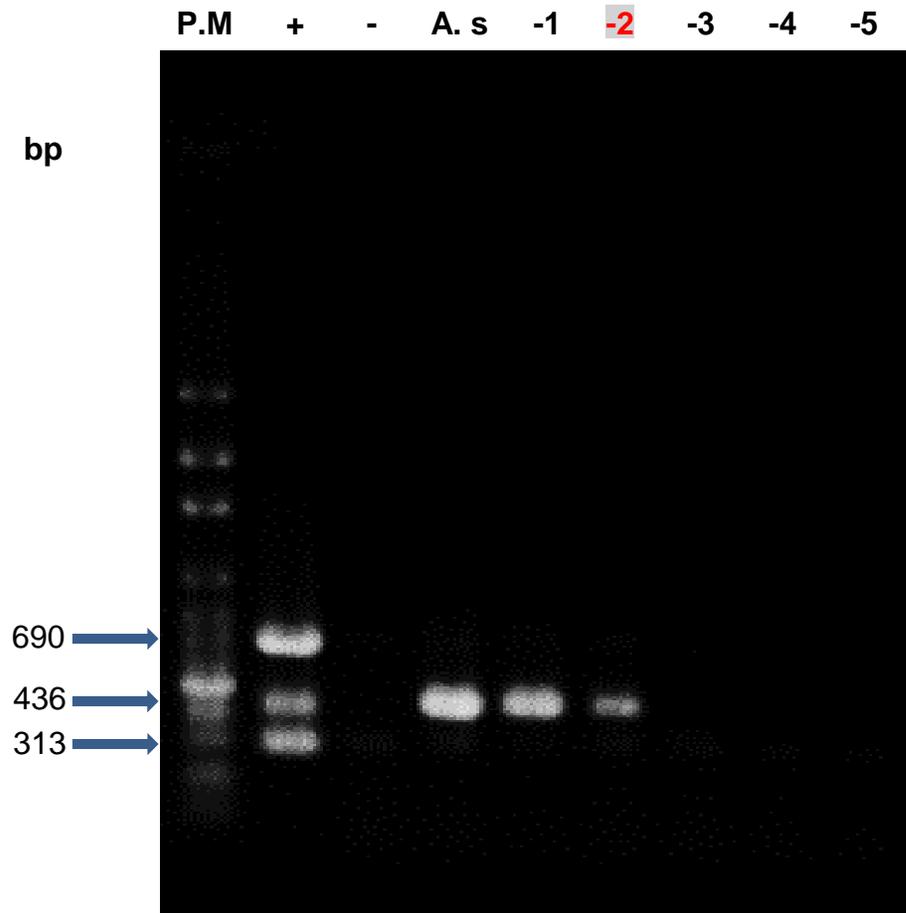
**CUADRO 5:**

**Quantificación del DNA de las Diluciones de *A. seminis*.**

	Dilución	ng/ $\mu$ l
<i>Actinobacillus seminis</i>	--	43.14
<i>Actinobacillus seminis</i>	-1	31.14
<b><i>Actinobacillus seminis</i></b>	<b>-2</b>	<b>7.64</b>
<i>Actinobacillus seminis</i>	-3	6.35
<i>Actinobacillus seminis</i>	-4	6.04
<i>Actinobacillus seminis</i>	-5	6.04
<i>Actinobacillus seminis</i>	-6	5.5
<i>Actinobacillus seminis</i>	-7	4.1
<i>Actinobacillus seminis</i>	-8	3.79
<i>Actinobacillus seminis</i>	-9	3.69
<i>Actinobacillus seminis</i>	-10	2.69

**FIGURA 5:**

**PCR multiplex de *Actinobacillus seminis* dilución (-1 a -5).**



Nuestra técnica de PCR multiplex para *Actinobacillus seminis* detecta hasta 7.64 ng/ $\mu$ l de DNA, en la dilución a la -2 como se muestra en la figura.

**Sensibilidad de *Histophilus somni*.**

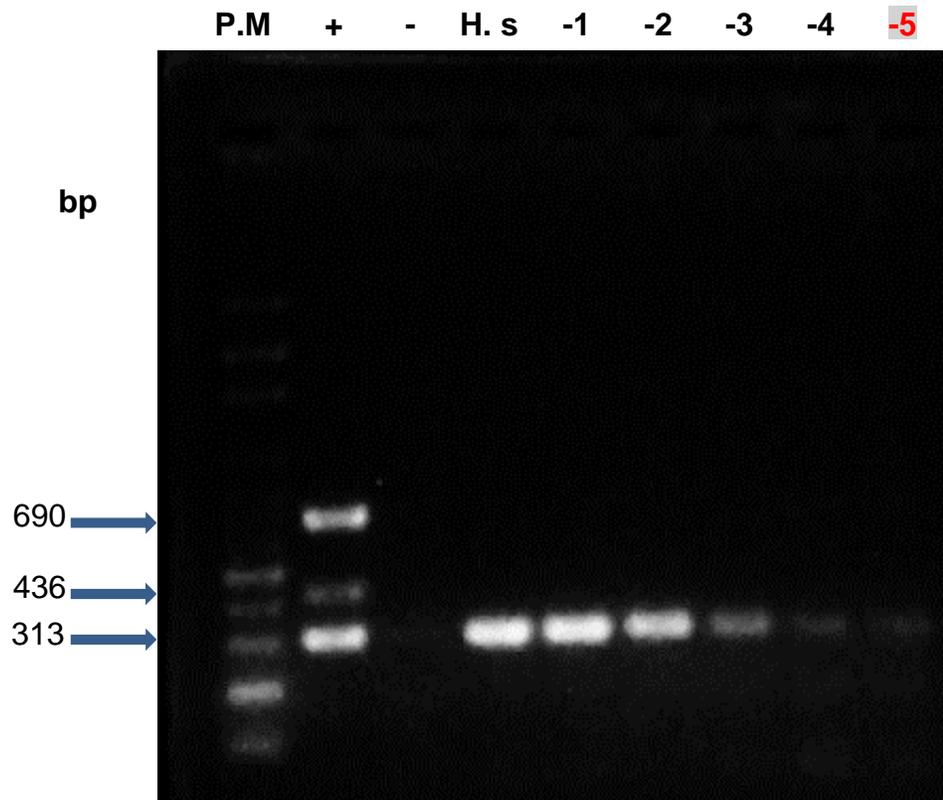
**CUADRO 6:**

**Cuantificación del DNA de las Diluciones de *H. somni*.**

	Dilución	ng/μl
<i>Histophilus somni</i>	--	23.54
<i>Histophilus somni</i>	-1	12.85
<i>Histophilus somni</i>	-2	8.59
<i>Histophilus somni</i>	-3	8.4
<i>Histophilus somni</i>	-4	8.35
<i>Histophilus somni</i>	-5	6.45
<i>Histophilus somni</i>	-6	6.04
<i>Histophilus somni</i>	-7	5.24
<i>Histophilus somni</i>	-8	4.85
<i>Histophilus somni</i>	-9	4.44
<i>Histophilus somni</i>	-10	2.99

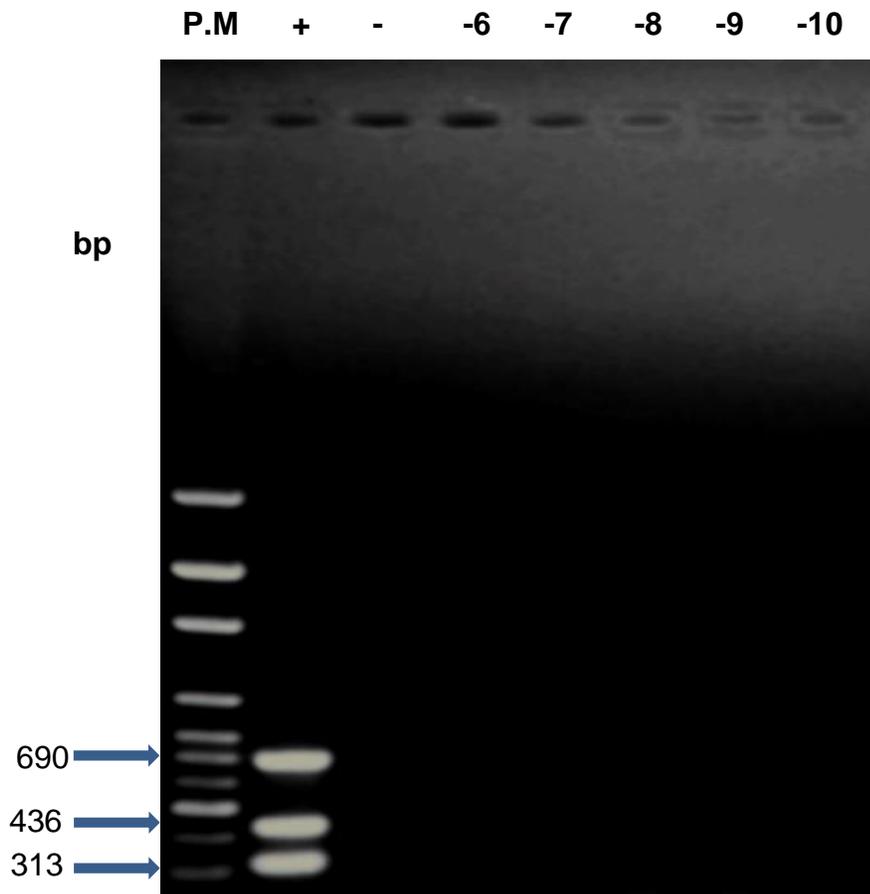
FIGURA 6:

PCR multiplex de *Histophilus somni* dilución (-1 a -5).



**FIGURA 7:**

**PCR multiplex de *Histophilus somni* dilución (-6 a -10).**



Nuestra técnica de PCR multiplex para *Histophilus somni* detecta hasta 6.45 ng/ $\mu$ l de DNA, en la dilución a la -5 como se muestra en las figuras.

### Pruebas de Especificidad.

Para probar la especificidad de nuestra técnica de PCR multiplex realizamos la extracción, el conteo de DNA y la PCR para algunas bacterias, nuestros resultados fueron los siguientes:

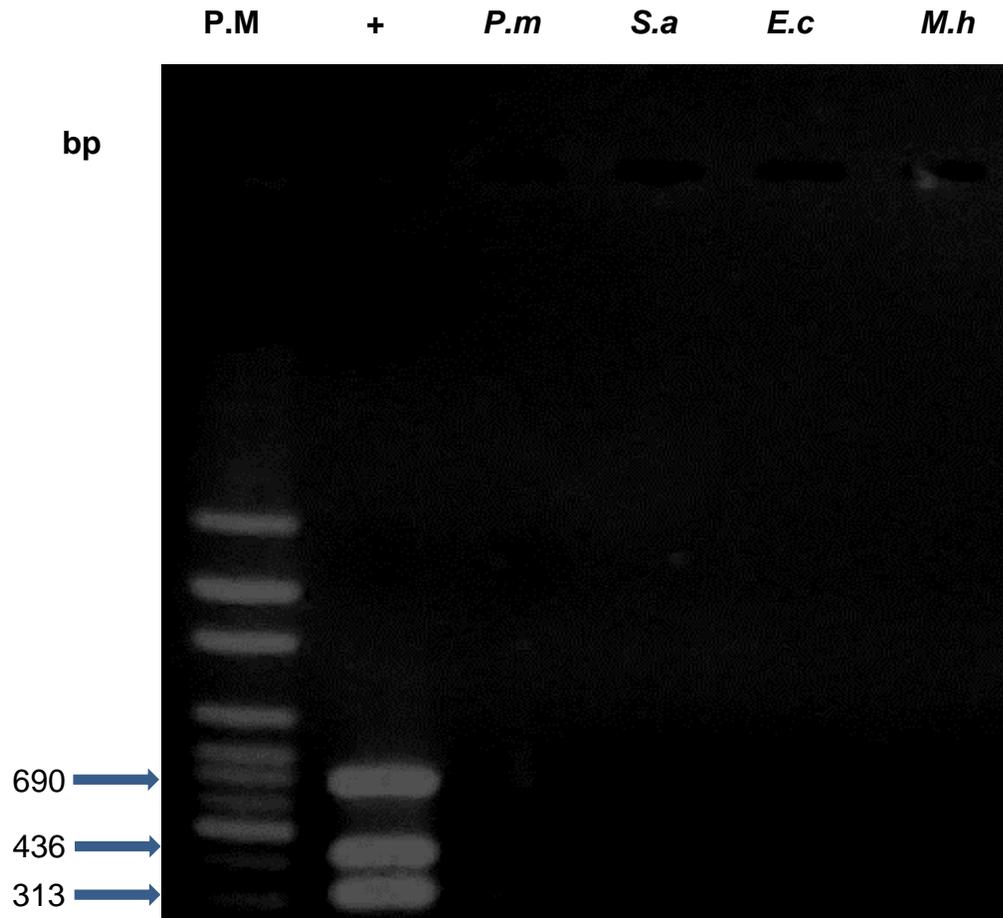
#### CUADRO 7:

**Cuantificación del DNA de *Pasteurella multocida*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Mannhemia haemolytica*.**

	ng/ $\mu$ l
<i>Pasteurella multocida</i>	14.54
<i>Staphylococcus aureus</i>	249.94
<i>Escherichia coli</i>	43.19
<i>Mannhemia haemolytica</i>	20.89

**FIGURA 8:**

**PCR multiplex de *Pasteurella multocida*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Mannhemia haemolytica*.**



Nuestra técnica de PCR multiplex no amplifica éstas bacterias, por lo tanto es específica para *B. ovis*, *A. seminis* y *H. somni*.

**Prueba de muestras de semen de animales IDGA positivos.**

En 9 de las 14 muestras se logró amplificar el ADN de *B. ovis* una de estas 9 también se demostró la presencia de ADN de *A. seminis* a pesar de que en el análisis serológico no se detectaron anticuerpos contra esta bacteria. Ninguna muestra de semen resultó positiva a *H. somni*.

## X. DISCUSIÓN

La epididimitis ovina es una enfermedad infecciosa, contagiosa, progresiva e irreversible, los principales microorganismos involucrados son *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* e *Histophilus somni*. El diagnóstico bacteriológico en semen de estos tres microorganismos resulta muchas veces engorroso por la presencia de bacterias contaminantes del semen o del prepucio que enmascaran el crecimiento de estos microorganismos exigentes y de lento crecimiento y ninguna de las pruebas serológicas disponibles son 100% sensibles (Saunders *et al.*, 2007).

La identificación bacteriológica de *B. ovis* necesita de medios enriquecidos con 5 a 10% de sangre de ovino y en condiciones microaerófilas (5 al 10% de CO<sub>2</sub>), o medios selectivos como el de Thayer-Martin (Brown *et al.*, 1971) que facilita su aislamiento a partir de muestras seminales que suelen contener un número elevado de contaminantes, que pueden enmascarar las colonias de *B. ovis* por su pequeño tamaño y de lento crecimiento. Para el caso de *A. seminis* el crecimiento óptimo ocurre cuando es incubado en una atmósfera de 10% de CO<sub>2</sub> y 37°C de temperatura, su crecimiento se ve favorecido con el agregado de sangre o suero. Luego de 24 horas se observan las colonias del tamaño de una cabeza de alfiler, a las 48 horas alcanzan un diámetro de 1-2 mm, a los cuatro días adquieren un diámetro mayor de 3 mm de color gris blanquecino, *A. seminis* es generalmente catalasa positivo y oxidasa negativo, indol negativo y no fermenta la glucosa. No se desarrollan en agar MacConkey (Swanepoel, 1984). La mayoría de las cepas no reducen nitratos a nitritos, pero puede ocurrir ocasionalmente (van Tonder, 1979b)

dada las variaciones en las reacciones bioquímicas que presentan algunos aislamientos se dificulta su identificación por estos métodos.

Por otro lado dada la similitud existente entre *A. seminis* y las bacterias del grupo Haemophilus-Histophilus (H-H) actualmente *Histophilus somni*, tanto por morfología como por su actividad metabólica es necesario recurrir a técnicas de biología molecular para poder realizar una distinción clara.

En el diagnóstico de *B. ovis* se han aplicado varios métodos serológicos: fijación de complemento (FC) (Biberstein *et al.*, 1962), hemaglutinación indirecta (HAI), inmunodifusión en gel (IDD) y ensayo inmunoenzimático ELISA, sin embargo con ninguno de ellos se logran resultados concluyentes, pues son frecuentes los falsos negativos y se ha señalado que esta situación no depende de la sensibilidad de la técnica empleada. Así se da el caso de que en una muestra de suero se detectan anticuerpos con la técnica de IDGA y resultan negativos los intentos con FC o ELISA. Para reducir errores diagnósticos, es recomendable realizar más de un estudio serológico separados en tiempo y aplicar en cada caso más de una técnica por otro lado puede resultar que animales seropositivos no eliminen la bacteria a través del eyaculado o lo hagan en forma intermitente (Worthington *et al.*, 1985).

Por lo tanto la PCR multiplex proporciona la oportunidad de identificar rápidamente estos patógenos, directamente en muestras de semen y niega el efecto de enmascaramiento de los organismos contaminantes muchas veces presentes en las muestras de semen por las técnicas de extracción o por el barrido de las bacterias presentes en la parte final de la uretra peneana (Searson, 1982; Jansen, 1983; Acosta-Dibarrat *et al.*, 2006).

En este estudio se desarrolló un PCR multiplex para la detección de las tres bacterias principales que producen epididimitis en los ovinos, a partir de muestras de semen.

En un estudio de PCR multiplex realizado por Saunders *et al.* (2007) obtuvieron muy buenos resultados identificando *B. ovis*, *A. seminis* y *H. somni* igualmente a partir de muestras de semen, la determinación de la sensibilidad fue de  $5 \times 10^9$  para *B. ovis*,  $6.8 \times 10^7$  para *A. seminis* y  $8.1 \times 10^7$  para *H. somni*, bacterias viables por ml.; En presente estudio realizamos la cuantificación del DNA de cada bacteria, a través de diluciones para determinar la sensibilidad y los resultados que obtuvimos fueron para *B. ovis* detectando a un mínimo de 4.64 ng/μl correspondiente en la dilución a la 5; para *A. seminis* detectando a un mínimo de 7.64 ng/μl correspondiente a la dilución a la 2 y para *H. somni* detectando a un mínimo de 6.45 ng/μl en la dilución a la 5.

Por lo tanto este estudio ha demostrado que la técnica de PCR multiplex puede ser utilizada con éxito para la detección de las tres bacterias principales causantes de la epididimitis ovina. Igualmente puede ser utilizada como prueba complementaria en el diagnóstico serológico de estas bacterias. La técnica de PCR multiplex tiene mejores efectos en los resultados que los procedimientos de cultivo tradicionales ya que son más rápidas.

---

## XI. CONCLUSIONES

- 1.- Se logró estandarizar la prueba de PCR multiplex para el diagnóstico de *B. ovis*, *A. seminis* y *H. somni* principales agentes en la presentación de la epididimitis ovina.
- 2.- Se realizó la extracción de DNA a partir de muestras de semen contaminado de carneros.
- 3.- Se determinaron las condiciones específicas de temperatura y ciclos para la realización de la técnica de PCR multiplex.
- 4.- Se determinó la sensibilidad de la prueba de PCR multiplex realizando varias diluciones de la extracción del DNA de cada bacteria.
- 5.- Se logró determinar la especificidad que tiene nuestro PCR multiplex al salir negativos los resultados que obtuvimos de las pruebas que realizamos a algunas bacterias que también están involucradas en el aparato reproductor de los ovinos.

## **XII. SUGERENCIAS**

Se sugiere realizar estudios de campo más extensos con mayor número de muestras para reafirmar la estandarización de la técnica.

### XIII. LITERATURA CITADA

- Acosta-Dibarrat JP. (2001): Patogenia de la epididimitis por *Actinobacillus seminis* en ovinos. Tesis de Maestría, Ciencias de la Producción y la Salud Animal, Universidad Nacional Autónoma de México, Toluca, México.
- Acosta-Dibarrat JP, Díaz Aparicio E, Arellano Reynoso B, Tenorio Gutiérrez V, Tórtora Pérez J. (2006): Inducción experimental de epididimitis en ovinos por inoculación intrauretral con *Actinobacillus seminis*: estudio bacteriológico, serológico e histopatológico. *Técnica Pecuaria en México*. 44:257-267.
- Acosta Dibarrat JP, Diaz Aparicio E, Tenorio Gutiérrez V, Suarez Guemes F, Tórtora Pérez J. (2007): Determination of Pathological Changes in the Reproductive Tract, IgG, IgM and IgA Antibodies in Blood, Seminal Plasma and Smegma of Rams Inoculated with *Actinobacillus seminis*. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 6:105-113.
- Ajai CO, Cook JE, Dennis SM. (1980): Diagnosing ovine epididymitis by immunofluorescence. *Veterinary Record*. 107:421-424.
- Appuhamy S, Coote JG, Low JC, Parton R. (1998a): PCR methods for identification and characterization of *Actinobacillus seminis* strains. *Journal Clinical Microbiology*. 36:814-817.
- Appuhamy S, Low JC, Parton R, Coote JG. (1998b): Specific PCR primers from the 16S-23S rRNA spacer region for the rapid detection and identification of *Actinobacillus seminis*. *Journal Applied Microbiology*. 85:941-948.
- Bagley CV, Paskett ME, Matthews NJ, Stenquist NJ. (1985): Prevalence and causes of ram epididymitis in Utah. *Journal of the American Veterinary Medicine Association*. 18:798-801.
- Baynes ID, Simmons GC. (1960): Ovine epididymitis caused by *Actinobacillus seminis*. *Australian Veterinary Journal*. 36:454-459.
- Beeman KB, Hummels S, Rahaley R. (1982): Epididymitis in rams. *Veterinary Medicine/ Small Animal Clinician*. 77:1647-1650.
- Biberstein EL, McGowan B, Olander H, Kennedy PC. (1964): Epididymitis in rams studies on pathogenesis. *Cornell Veterinarian*. 54:27-41.
- Biberstein EL, McGowan B, Robinson EA, Harrold DR. (1962): Epididymitis in rams. Studies on immunity. *Cornell Veterinarian*. 52:215-227.
- Brown GM, Pietz DE, Price DA. (1973): Studies on the transmission of *B. ovis* infection of rams. *Cornell Veterinarian*. 63:29-40.
- Brown GM, Ranger CR, Kelley DJ. (1971): Selective media for the isolation of *Brucella ovis*. *Cornell Veterinarian*. 61:265-280.

- Bulgin MS, Anderson BC. (1983): Association of sexual experience with isolation of various bacteria in cases of ovine epididymitis. *Journal of American Veterinary Medicine Association*. 182:372-374.
- Cardenas LA, Maki LR. (1986): Detection of antibody in rams with contagious epididymitis, using the enzyme-linked immunosorbent assay. *American Journal of Veterinary Research*. 47:738-739.
- Cousins DV, Lloyd JM. (1988): Rapid Identification of *Haemophilus somnus*, *Histophilus ovis* and *Actinobacillus seminis* using the APIZYM system. *Veterinary Microbiology*. 17:75-81.
- De Long WJ, Waldhalm DG, Hall RF. (1979): Bacterial isolates associated with epididymitis in rams from Idaho and Eastern Oregon flocks. *American Journal of Veterinary Research*. 40:101-102.
- De Wet JAL, Erasmus JA. (1984): Epididymitis of rams in the central and Southern districts of the Orange Free State. *Journal of South African Veterinary Association*. 55:173-179.
- Ficapal A, Jordana J, Blasco JM, Moriyón I. (1998): Diagnosis and epidemiology of *Brucella ovis* infection in rams. *Small Ruminant Research*. 29:13-19.
- Genetzky RM. (1995): Epididymitis in Rams. *The Compendium Food Animal*. 17:447-454.
- Grilló MJ, Marín CM, Barberán M, Blasco JM. (1999): Experimental *Brucella ovis* infection in pregnant ewes. *Veterinary Record*. 144:555-558.
- Gutiérrez-Hernández JL, Garrido-Fariña GF, Acosta-Dibarrat JP, Díaz- Aparicio E, Tenorio-Gutiérrez TG, Tórtora-Pérez JL. (2015): Diagnóstico serológico, histopatológico y molecular de epididimitis ovina en carneros de Zacatecas, México. *Que hacer Científico en Chiapas* 10 (2): 16-23.
- Hafez ESE. (1993): *Reproduction in farm animals*. 6ed. Ed. Lea & Febiger. USA. pp. 177, 402-404.
- Heath PJ, Davies JH, Morgan-Aitken IA. (1991): Isolation of *Actinobacillus seminis* from rams in the United Kingdom. *Veterinary Record*. 129:304-307.
- Hughes KL. (1972): Experimental *Brucella ovis* infection in ewes. 2. Correlation of infection and complement fixation titres. *Australian Veterinary Journal*. 48:18-22.
- Jansen BC. (1983): The epidemiology of bacterial infection of the genitalia in rams. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 50:275-282.
- Marín CM, Blasco JM. (2001): Diagnóstico bacteriológico de la Brucelosis Animal. En: Díaz E, Hernández L, Valero G, Arellano B. Ed. *Diagnóstico de Brucelosis Animal*. INIFAP, México. pp 28-55.

- Marin CM, Jiménez-de Begues MP, Blasco JM, Gamazo C, Moriyon UI, Díaz R. (1989): Comparison of three serological tests for *Brucella ovis* infection of ram using different antigenic extracts. *Veterinary Record*. 125:504-508.
- Mc Gillivery DJ, Webber JJ. (1989): Genetic homogeneity of *Actinobacillus seminis* isolates. *Research in Veterinary Science*. 46:424-425.
- Méndez NG, Díaz AE, Morales JF, Aguilar RF, Suarez GF. (1999): Epididimitis ovina: estudios bacteriológicos y serológicos. *Veterinaria México*. 30:329-336.
- Palomares G, Aguilar F, Hernández L, Acosta-Dibarrat JP, Herrera E, Tenorio V. (2005): Isolation and characterization of *Haemophilus somnus* (*Histophilus somni*) present in semen of rams with epididymitis. *Small Ruminant Research*. 60:221-312.
- Plant JW, Eamens GJ, Seaman JT. (1986): Serological, bacteriological and pathological changes in rams following different routes of exposure to *Brucella ovis*. *Australian Veterinary Journal*. 63:409-412.
- Riezu-Boj JI, Moriyon I, Blasco JM, Marin CM. & Diaz R. (1986): Comparison of lipopolysaccharide and outer membrane protein-lipopolysaccharide extracts in an enzyme-linked immunoabsorbent assay for the diagnosis of *Brucella ovis* infection. *Journal Clinical Microbiology*. 23:938-942.
- Santos JM, Verstrete DR, Perera VY. & Winter AJ. (1984): Outer membrane proteins from rough strains of four *Brucella* species. *Infection and Immunity*. 46:188-194.
- Saunders VF, Reddacliff LA, Berg T, Hornitzky M. (2007): Multiplex PCR for the detection of *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* and *Histophilus somni* in ram semen.
- Searson JE. (1982): Sensitivity and specificity of two microtitre complement fixation test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *Australian veterinary Journal*. 58:5-7.
- Simmons GC, Baynes BV, Ludford B. (1966): Epidemiology of *Actinobacillus seminis* in a folk of Border Leicester sheep. *Australian veterinary Journal*. 42:183-187.
- Sneath PHA, Stevens M. (1990): *Actinobacillus rossii* sp. nov., *Actinobacillus seminis* sp. nov., nom. rev., *Pasteurella bettii* sp. nov.; *Pasteurella lymphangitidis* sp. nov., *Pasteurella mairi* sp. nov., and *Pasteurella trehalosi* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 40:148-153.

- Stephens LR, Humphrey JD, Little PB, Barnum DA. (1983): Morphological, biochemical, antigenic, and cytochemical relationships among *Haemophilus somnus*, *Haemophilus agni*, *Haemophilus haemoglobinophilus*, *Histophilus ovis*, and *Actinobacillus seminis*. *Journal Clinical Microbiology*. 17:728-737.
- Swanepoel ML. (1984): A study for differentiation of *Actinobacillus seminis*, *A. actinomycetemcomitans*, *Histophilus ovis* and *Pasteurella Haemolytica*. *Onderstepoort Journal Veterinary Research*. 51:41-46.
- Tekes L, Hajtos I. (1990): Trials with an Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA) for the diagnosis of subclinical genital infections in rams caused by *Histophilus ovis* and *Actinobacillus seminis*. *Journal Veterinary Medicine B*. 37:549-555.
- Van Tonder EM. (1979a): *Actinobacillus seminis* infection in sheep in the Republic of South Africa I. Identification of the problem. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 46:129-133.
- Van Tonder EM. (1979b): *Actinobacillus seminis* infection in sheep in the Republic of South Africa III. Growth and cultural characteristics of *A. seminis*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 46:141-148.
- Walker RL, Leamaster BR, Stellflug JN, Biberstein EL. (1986): Association of age of ram with distribution of epididymal lesions and etiologic agent. *Journal of American Veterinary Medical Association*. 188:393-396.
- Worthington RW, Stevenson BJ, de Lisle GW. (1985): Serology and semen culture for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in chronically infected rams. *New Zealand Veterinary Journal*. 33:84-86.

## **XIV. ANEXOS**

### **ANEXO 1.**

#### **ELECTROFORESIS PARA VISUALIZACION DE DNA**

##### **1.- Preparación de Solución de TAE Buffer a 1x.**

###### **Material:**

- Ultra-Pure™ (Invitrogen) 10x TAE Buffer (10x solution).
- Probeta 1000 ml.
- Probeta 100 ml.
- Agua destilada.
- Recipientes (2).

###### **Método:**

- ✓ Se agregan 900 ml de agua destilada a un recipiente.
- ✓ Se agregan 100 ml de Ultra-Pure 10x TAE Buffer.
- ✓ Se mezcla perfectamente.
- ✓ Obtenemos nuestra solución de TAE Buffer al 1x.

##### **2.- Preparación de Agarosa al 1%.**

###### **Material:**

- Ultra-Pure™ (Invitrogen) Agarose.
- Probeta 100 ml.
- Recipiente.
- Báscula (g).
- Solución TAE Buffer al 1x.

- Microondas.
- Guantes.

**Método:**

- ✓ Se vierten 100 ml de solución TAE Buffer al 1x.
- ✓ Se pesa 1g de Ultra-Pure Agarose.
- ✓ Se mezcla el gramo de Agarose en la solución TAE Buffer al 1x.
- ✓ Se mete al microondas durante 1 o 2 minutos hasta obtener una apariencia transparente.
- ✓ De este modo la solución está lista para la cámara de electroforesis.

**3.- Cámara de Electroforesis**

**Material:**

- Cámara de Electroforesis.
- Micropipeta – Puntas.
- Bromuro de etidio.
- Solución de TAE Buffer al 1x.
- Transiluminador (luz ultravioleta).

**Método:**

- ✓ Una vez obtenida la solución de la preparación de la agarosa, ésta se coloca en el “carro o placa” de la cámara de electroforesis, se deja reposar hasta obtener el gel.
- ✓ El gel se coloca en la placa de la cámara de electroforesis con el peine que se adecúe al número de muestras a observar (número de pozos necesarios para la observación del producto final de la PCR).
- ✓ Se agrega bromuro de etidio a la solución de TAE Buffer al 1x.

- 
- ✓ Se vierte la solución de TAE Buffer al 1x a la cámara de electroforesis hasta tapar el gel, posteriormente se retirará el peine.
  - ✓ Se tomarán 5µl de muestra (producto final de la PCR) y se mezclarán con 2-3µl de buffer de carga, la mezcla obtenida será colocada en un pozo del gel de agarosa.
  - ✓ Se coloca en el primer pozo del gel 5-7µl de marcador molecular , en el segundo el control positivo del producto final de la PCR, en el tercer pozo el control negativo y del cuarto pozo en adelante los productos finales de la PCR de las muestras.
  - ✓ La separación por peso molecular de los productos obtenidos de la PCR en el gel de agarosa se logrará mediante el paso de cargas eléctricas, para ello se conecta a la fuente de poder de la cámara a 130 volts durante 15 minutos aproximadamente.
  - ✓ Se observa el gel en el Transiluminador de luz ultravioleta para observar el contenido de ADN.

## **ANEXO 2.**

### **ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA PROTOCOLO DE LA EXTRACCIÓN DE DNA**

De acuerdo al protocolo del Kit (DNeasy Blood and Tissue, Quiagen). Para extracción de DNA de bacterias Gram negativas.

Pretratamiento para bacterias Gram negativas.

1. Cosechar las células (máximo  $2 \times 10^9$  células) en un tubo de microcentrífuga. Centrifugar por 10 minutos a 7500 rpm y descartar el sobrenadante (200  $\mu$ l de muestra).
2. Resuspender el pellet en 180  $\mu$ l de buffer ALT. Protocolo de purificación de DNA total de Tejidos Animales (Spin Column Protocol).
3. Adicionar 20  $\mu$ l de proteinasa K y mezclar en el vortex. Incubar a 56°C por 1-3 horas hasta que el tejido este completamente lisado, se puede mezclar en el vortex ocasionalmente durante la incubación. Se debe obtener una consistencia viscosa, no gelatinosa.
4. Se mezcla en el vortex por 15 segundos. Adicionar 200  $\mu$ l de buffer AL a la muestra y se mezcla nuevamente con ayuda del vortex. Adicionar 200  $\mu$ l de etanol (96-100%) y se mezcla en el vortex (El buffer AL y el etanol pueden ser premezclados antes de adicionarse a la muestra).
5. Del tubo de microcentrífuga (Eppendorf) se pipetea la muestra incluyendo cualquier precipitado al DNeasy Mini Spin con su tubo colector. Centrifugar a 8000 rpm durante un minuto. Se descarta el tubo colector.

6. Se coloca un nuevo tubo colector. Adicionar 500 µl de buffer AW1 al DNeasy Mini Spin. Centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm. Nuevamente se descarta el tubo colector.
7. Se coloca un nuevo tubo colector. Adicionar 500 µl de buffer AW2 al DNeasy Mini Spin. Centrifugar durante 3 minutos a 14 000 rpm. Nuevamente se descarta el tubo colector.
8. Colocar el DNeasy Mini Spin Column en un tubo de microcentrífuga (Eppendorf) de 1.5-2 ml. Pipetear 100 µl de buffer AE directo en la DNeasy membrana. Incubar a temperatura ambiente durante un minuto. Centrifugar por un minuto a 8000 rpm para extraer el DNA.
9. Repetir el paso 8.