

# Inducción experimental de epididimitis en ovinos por inoculación intrauretral con *Actinobacillus seminis*: estudio bacteriológico, serológico e histopatológico

## Experimental induction of epididymitis in sheep, by intra-urethral inoculation of *Actinobacillus seminis*: A bacteriological, serological, and histopathological study

Jorge Acosta Dibarrat<sup>a</sup>, Efrén Díaz Aparicio<sup>b</sup>, Beatriz Arellano Reynoso<sup>b</sup>, Víctor Rubén Tenorio Gutiérrez<sup>b</sup>, Jorge Tórtora Pérez<sup>a</sup>

### RESUMEN

Con el objetivo de inducir la infección experimental de *A. seminis*, se utilizaron 18 corderos de seis meses de edad: 4 testigos negativos, otros 3 se inocularon con *A. seminis* vía intraepididimal (IE) y 11 fueron inoculados por vía intrauretral (IU) como sigue: cuatro recibieron factor liberador de gonadotropinas (GnRH) cinco días previos al desafío, cuatro recibieron etilenglicol por vía IE 24 h previas al desafío y tres no recibieron tratamiento previo. De los cuatro testigos negativos, dos recibieron GnRH y dos etilenglicol. Se tomaron muestras semanales de suero para inmunodifusión, y de semen para bacteriología. Se sacrificaron a los 35 días posinoculación, obteniéndose testículos, epidídimos y glándulas anexas, para estudios bacteriológicos e histopatológicos. Del grupo tratado con GnRH, se recuperó la bacteria del semen pero no del aparato reproductor, aunque se observaron lesiones en 3 de 4 animales. Del grupo estimulado con etilenglicol, en uno se aisló *A. seminis* de ámpulas del deferente y de vesícula seminal. De los desafiados sin tratamiento previo, en 2 de 3 se aisló la bacteria del semen. De los tres inoculados IE, en uno se aisló del lugar de inoculación y en dos se aisló de una de las glándulas anexas. En la serología de los desafiados por vía IU, 2 de 11 resultaron positivos; de los 3 inoculados IE, 2 resultaron positivos. Las observaciones histopatológicas correspondieron a lesiones típicas de epididimitis con infiltrados inflamatorios en glándulas anexas. Los resultados sugieren que las glándulas anexas pueden ser un reservorio de *A. seminis*.

**PALABRAS CLAVE:** *Actinobacillus seminis*, Epididimitis, Ovinos.

### ABSTRACT

*Actinobacillus seminis* infection was experimentally induced in 18 6-month-old lambs. Four animals were kept as negative controls, three animals were inoculated with *A. seminis* by the intra-epididymal (IE) route, and 11 lambs were inoculated by the intra-urethral (IU) route, as follows: Five days prior to challenge, 4 lambs were given gonadotropin-releasing factor (GnRH); 4 lambs received ethylene glycol IE 24 h prior to challenge, and 3 lambs received no previous treatment. Two of the 4 negative controls received GnRH, and 2 received ethylene glycol. Serum samples were collected weekly for immunodiffusion. Similarly, semen samples were collected for bacteriological analysis. Animals were slaughtered 35 d postinoculation. Testis, epididymis, and accessory sex gland samples were collected for bacteriological and histopathological analyses. *A. seminis* was isolated from the semen of the GnRH-treated group, but not from the reproductive tract. Lesions had been previously observed in 3 of these 4 animals. *A. seminis* was isolated from both the ampulla ductus deferens and from the seminal vesicle of one ethylene glycol-treated animal. *A. seminis* was isolated from the semen of 2 of the 3 lambs that were challenged with no previous treatment. *A. seminis* was isolated from the inoculation site of one lamb and from the accessory sex glands of 2 of the 3 IE-inoculated lambs. Two of the 11 IU-inoculated lambs showed positive serological results. Two of the 3 IE-inoculated lambs had positive serological results. Histopathological lesions were consistent with epididymitis, including inflammatory infiltrates in the accessory glands. Results suggest that the accessory sex glands can be an *A. seminis* reservoir.

**KEY WORDS:** *Actinobacillus seminis*, Epididymitis, Sheep.

Recibido el 10 de mayo de 2005 y aceptado para su publicación el 20 de diciembre de 2005.

<sup>a</sup> Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México.

<sup>b</sup> CENID-Microbiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Km. 15.5 carretera federal México-Toluca, Palo alto, Delegación Cuajimalpa, 05110 Distrito Federal, Teléfono: 55703100 extensión 44. efredia@yahoo.com. Correspondencia al segundo autor.

La epididimitis infecciosa en los carneros es considerada una enfermedad económicamente importante, por sus efectos adversos sobre la fertilidad, y ha sido primordialmente asociada a infecciones por *Brucella ovis* y *Actinobacillus seminis*<sup>(1,2)</sup>.

*A. seminis* ha sido aislado en casos de epididimitis y a partir de muestras de semen en Australia<sup>(3)</sup>, Nueva Zelanda<sup>(4)</sup>, Estados Unidos de Norte América<sup>(5)</sup>, México<sup>(6)</sup>, Reino Unido<sup>(7)</sup> y más recientemente en España<sup>(8)</sup>.

Esta patología se establece cuando los borregos alcanzan la madurez sexual, pero por ser una condición irreversible, también se diagnostica en carneros adultos<sup>(9,10)</sup>. La patogenia de la epididimitis es incierta; Jansen<sup>(11)</sup> sugiere que *A. seminis* es un microorganismo oportunista presente en la cavidad prepucial, capaz de colonizar las partes profundas del tracto genital, provocando epididimitis en los animales jóvenes más vigorosos y de mayor velocidad de crecimiento. Se ha sugerido que la lesión traumática del epidídimo, la subsiguiente liberación de histamina y la colección de pequeñas cantidades de fluidos ricos en proteínas, favorece la colonización por estos microorganismos. Estos traumatismos pueden causar la ruptura del conducto epididimal, iniciando la formación de granulomas espermáticos mediados por condiciones autoinmunes sin presencia de bacterias<sup>(12)</sup>.

Se ha propuesto la participación de factores hormonales en la migración de los microorganismos desde la mucosa peniana hasta el epidídimo y el testículo, considerando los cambios que ocurren en el aparato reproductor durante la pubertad, especialmente en las células del epitelio epididimal<sup>(13)</sup>.

No se han logrado definir modelos experimentales que permitan reproducir en forma consistente la enfermedad, y esta situación ha impedido esclarecer su patogenia, los mecanismos de respuesta inmune, y en consecuencia el establecimiento de medidas de control y profilaxis eficaces.

El principal objetivo de este trabajo fue inducir la infección experimental de *A. seminis* mediante inoculación intrauretral, evaluando posibles diferencias en la susceptibilidad a la infección, entre

Ovine infectious epididymitis is regarded as an economically-important disease, because of its deleterious impact on fertility. It has been mainly associated with *Brucella ovis* and *Actinobacillus seminis* infections<sup>(1,2)</sup>.

*A. seminis* has been isolated from semen samples of sheep with epididymitis in Australia<sup>(3)</sup>, New Zealand<sup>(4)</sup>, USA<sup>(5)</sup>, México<sup>(6)</sup>, the UK<sup>(7)</sup> and more recently in Spain<sup>(8)</sup>.

This condition is established when sheep reach sexual maturity. Being a non-reversible condition, it is also diagnosed in adult rams<sup>(9,10)</sup>. Epididymitis pathogenicity remains unclear; Jansen<sup>(11)</sup> suggested that *A. seminis* is an opportunistic germ present in the prepucial cavity, that can colonize deep genital structures, resulting in epididymitis in the strong, fast-growing young lambs. It has been suggested that epididymis trauma, followed by histamine release, and the collection of small amounts of high-protein fluids, promote the colonization with these bacteria. Epididymis trauma can result in rupture of the epididymis ductus. This initiates the formation of non-bacterial, autoimmune-mediated sperm granulomas<sup>(12)</sup>.

The involvement of hormone factors on bacterial migration from the penis mucosa to the epididymis and the testis has been proposed, considering the changes that occur in the reproductive tract – particularly in the cells of the epididymal epithelium – during puberty<sup>(13)</sup>.

Experimental models allowing for the consistent reproduction of the disease have not been developed. Pathogenicity/immune mechanisms have not been clearly understood. Therefore, efficacious control/prophylactic measures have not been established so far.

The main objectives of this research were to induce the experimental infection with *A. seminis* by intra-urethral inoculation, to evaluate possible infection susceptibility differences among rams with no treatment prior to inoculation and those receiving various previous treatments (i.e.: a hormone [GnRH], trauma/irritation [ethylene glycol] that could predispose animals to infection.

Eighteen male, 6-month-old, short-hair (*Pelibuey*) sheep (average body weight: 26.2 kg) from a herd

carneros sin tratamiento previo a la inoculación y aquéllos sometidos a tratamiento hormonal (GnRH) y traumático-irritativo (etilenglicol), que podrían actuar como factores predisponentes a la infección.

Se emplearon 18 borregos machos de raza Pelibuey, de seis meses de edad, con un peso promedio de 26.2 kg, provenientes de un rebaño sin antecedentes de epididimitis. Se constató clínicamente que todos los animales estaban libres de epididimitis, y también resultaron negativos a la prueba serológica de inmunodifusión doble (IDD) para *A. seminis* y *B. ovis*. Se les colectó semen mediante electroeyaculación; el cultivo bacteriológico resultó negativo y no se observaron células inflamatorias.

Los animales se distribuyeron en seis grupos (Cuadro 1):

Grupo 1: tratamiento hormonal con desafío intrauretral (IU) de *A. seminis*; previo al desafío, a los borregos de este grupo se les inyectó durante cinco días, por vía intramuscular 2.1 mg de acetato de buserelin, el cual es un análogo sintético de la GnRH (Conceptal Lab. Hoechst). El desafío por la vía IU se aplicó con el último tratamiento de GnRH.

Grupo 2: tratamiento traumático-irritativo del epidídimo con desafío por la vía IU de *A. Seminis*; el tratamiento traumático-irritativo se indujo mediante la inyección de 0.4 ml de un irritante químico (etilenglicol), en la cola del epidídimo

with no epididymitis history were used. Epididymitis freedom was verified in all animals. Sheep were also negative to both *A. seminis* and *B. ovis* by the double immunodiffusion (DID) serological test. Semen samples were obtained by electro-ejaculation. Bacteriological cultures were negative, and no inflammatory cells were observed.

Animals were assigned to six treatment groups (Table 1):

Group 1: Hormone treatment + intra-urethral (IU) *A. seminis* challenge. Before challenge, these animals were given 2.1 mg buserelin acetate –a GnRH synthetic analogue (Conceptal, Hoechst)– intramuscularly (IM) for 5 days. IU challenge was given together with the last GnRH treatment.

Group 2: Epididymis traumatic/irritative treatment + IU *A. Seminis* challenge. Traumatic/irritative treatment was induced injecting 0.4 ml ethylene-glycol (a chemical irritant) in the left epididymis tail. The skin was shaved/disinfected, and ethylene-glycol was applied 24 h prior to the IU inoculation of the pathogen.

Group 3: No previous treatment + IU *A. seminis* challenge.

Group 4: Control. Same hormone treatment as Group 1 + IU saline.

Group 5: Control, Epididymal traumatic/irritative

Cuadro 1. Grupos de ovinos inoculados con *A. seminis* por vía intrauretral (IU) con y sin tratamiento hormonal y traumático irritativo del epidídimo

Table 1. Groups of sheep inoculated intra-urethrally (IU) with *A. seminis* with or without hormone or traumatic/irritative treatment in the epididymis

Groups	Number of sheep	Treatment	<i>A. seminis</i> or placebo dose rate
1	4	GnRH treatment + IU inoculation with <i>A. seminis</i>	2 ml 1.6 x10 <sup>8</sup> CFU/ml
2	4	Traumatic/irritative treatment + IU <i>A. seminis</i> inoculation	2 ml 1.6 x10 <sup>8</sup> CFU/ml
3	3	No previous treatment + IU <i>A. seminis</i> inoculation	2 ml 1.6 x10 <sup>8</sup> CFU/ml
4	2	Control: GnRH treatment + IU saline	2 ml saline
5	2	Control: traumatic/irritative treatment + IU saline	2 ml saline
6	3	Intra-epididymal inoculation in the tail of the left epididymis with <i>A. seminis</i>	1 ml 1.6 x10 <sup>8</sup> CFU/ml

CFU = colony-forming units.

izquierdo. Se depiló, se desinfectó la piel y se aplicó el etilenglicol 24 h antes de la inoculación del patógeno por vía IU.

Grupo 3: sin tratamiento previo y desafío por vía IU de *A. seminis*.

Grupo 4: testigo, con tratamiento hormonal en la misma forma que al grupo 1, con inoculación de solución salina fisiológica (SSF) en la uretra.

Grupo 5: testigo, con tratamiento traumático-irritativo del epidídimo, con introducción de SSF por vía IU.

Grupo 6: testigo, inoculación por la vía intraepididimal (IE) de *A. seminis*.

La inoculación por la vía IU, se llevó a cabo con 2 ml de la suspensión bacteriana luego de realizar la ablación del proceso uretral, utilizando catéteres de sondeo uretral para gato. La inoculación por la vía IE, se realizó en la cola del epidídimo izquierdo previa limpieza y desinfección del escroto, con 1 ml de suspensión bacteriana.

El inóculo se preparó de la siguiente forma: la cepa de referencia ATCC 15768 de *A. seminis* se inoculó en placas de agar sangre ovina al 10%, las que se incubaron a 37 °C durante 48 h, en una atmósfera con 10% de CO<sub>2</sub> y se cosecharon con SSF. Al inóculo se le realizó conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) por el método de Miles *et al.*<sup>(14)</sup> y se estandarizó a una concentración de 1.6 x 10<sup>8</sup> UFC/ml.

Los animales se mantuvieron aislados en corraletas individuales, para evitar la posible transmisión de la bacteria entre ellos. Se les realizó examen clínico semanal, registrando las alteraciones en testículo y epidídimo.

Se colectaron muestras de suero para pruebas de inmunodifusión doble (IDD) y muestras de semen para bacteriología cada siete días. La extracción del semen se realizó con electroeyaculador<sup>(15)</sup>. Los animales fueron sacrificados humanitariamente a los 35 días posteriores a la inoculación (PI); se colectaron vesículas seminales, ámpulas del conducto deferente, glándulas bulbouretrales, testículos, así como cola y cabeza de los epidídimos.

treatment + IU saline.

Group 6: Control, Intra-epididymal (IE) *A. seminis* inoculation.

IU inoculation was performed using 2 ml bacterial suspension, after ablation of the urethral process, using feline urethral-probing catheters. For IE inoculation, scrotum was first washed/disinfected, then 1 ml bacterial suspension was injected in the tail of the left epididymis.

Inoculum was prepared as follows: American Type Culture Collection (ATCC) 15768 *A. seminis* strain was inoculated on 10% sheep blood agar plates. Plates were incubated at 37 °C for 48 h, in a 10% CO<sub>2</sub> atmosphere, then harvested with saline. Inoculum colony-forming units (CFU's) were counted using the method described by Miles *et al.*<sup>(14)</sup>. Inoculum was then standardized to a 1.6 x 10<sup>8</sup> CFU/ml concentration.

Animals were kept isolated in individual pens in order to prevent potential transmission of the bacterium among them. Clinical examinations were performed weekly. Testis/epididymis alterations were recorded.

Serum samples were collected for DID. Semen samples were collected weekly by electro-ejaculation<sup>(15)</sup> for bacteriological analysis. Thirty five days postinoculation (PI), animals were humanely slaughtered. Semen vesicles, ampullae ductus deferens, bulbo-urethral glands, testis, and epididymis tail/head samples were collected. A part of the samples was frozen for further bacteriological analysis, and the remainder was fixed in Bouin's solution then included in paraffin. Five mm thick cuts were performed, and stained with hematoxylin/eosin for histopathological examination.

Semen samples were seeded on 10% sheep blood agar then incubated at 37 °C under a 10% CO<sub>2</sub> atmosphere for up to 7 d<sup>(7,9)</sup>. Suspicious colonies were Gram stained. Isolates were biochemically characterized (catalase, oxidase, nitrates, indol, urea, hydrogen sulfide production, and glucose utilization<sup>(10)</sup>). Suspicious colonies were definitely identified by the polymerase chain reaction (PCR) using the primers described by Appuhamy<sup>(2)</sup>.

Parte de las muestras se conservaron en congelación para emplearlas en estudios bacteriológicos, y el resto se fijó en solución de Bouin para estudios histopatológicos, se incluyeron en parafina y se realizaron cortes de 5 mm de espesor, que se tiñeron con hematoxilina y eosina.

Las muestras de semen se inocularon en agar sangre ovina al 10% y se incubaron a 37 °C en 10% de CO<sub>2</sub> hasta por siete días<sup>(7,9)</sup>. Se realizó la tinción de Gram a las colonias sospechosas. Los aislamientos se caracterizaron por pruebas bioquímicas: catalasa, oxidasa, nitratos, indol, urea, producción de ácido sulfhídrico y utilización de la glucosa<sup>(10)</sup>. Se identificaron en forma definitiva las cepas sospechosas por la técnica de PCR, con los iniciadores descritos por Appuhamy<sup>(2)</sup>.

Las muestras tisulares fueron maceradas en SSF estéril; posteriormente se efectuaron los procedi-

Tissue samples were macerated in sterile saline, then inoculated and incubated. Suspicious colonies were identified using the same procedures described for semen samples.

For DID tests, a soluble antigen was prepared using *A. seminis* ATCC 15768 reference strain<sup>(16)</sup>. DID was ran on a 0.5% in PBS agarose gel, pH 7.2. Gels were read 72 h later<sup>(16)</sup>.

Bacteriological, serological and histopathological results are shown in Tables 2 and 3. Histopathological epididymis lesions were characterized by epithelial hyperplasia with intraepithelial cysts. When *A. seminis* was inoculated directly in the epididymis tail, these cysts contained polymorphonuclears (PMN's). Some animals showed empty tubules in contrast with others whose tubules were totally impacted with sperm cells, suggesting obstruction. Epididymis head tubule

Cuadro 2. Bacteriología del semen y serología de ovinos inoculados con *A. seminis* por vía intrauretral (IU)

Table 2. Semen Bacteriological and serological results of intra-urethrally (IU)-inoculated sheep with *A. seminis*

Group	<i>A. seminis</i> recovery from semen (weeks)					Serology (weeks)				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1. GnRH + IU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	A.s	-	-	-	-	-	-	+	±
	-	A.s	-	-	-	-	-	-	±	+
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2. traumatic/irritative treatment + IU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3. No previous treatment + IU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	A.s	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	A.s	-	-	A.s	-	-	-	-	±
4. GnRH Control + IU saline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5. Traumatic/irritative control + IU saline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6. <i>A. seminis</i> inoculation in the tail of the epididymis	-	A.s	-	A.s	A.s	±	±	+	±	±
	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±
	A.s	-	-	-	-	+	+	+	+	+

A.s = *Actinobacillus seminis* positive isolation; - negative isolation.

+ positive to DID for *A. seminis*, ± questionable to DID for *A. seminis*, - negative to DID for *A. seminis*

Cuadro 3. Bacteriología e histopatología de los órganos del aparato reproductor, de ovinos inoculados con *A. seminis* por vía intrauretral (IU)

Table 3. Bacteriological/Histopathological results from reproductive organs of sheep after *A. seminis* intra-urethral (IU) inoculation

Group	Left testicle	Head of the left epididymis	Tail of the left epididymis	Right testicle	Head of the right epididymis	Tail of the right epididymis	<i>Ámpula ductus deferentis</i>	Seminal vesicle	Bulbo-urethral gland
1. GnRH + IU	-	-	EA	-	-	-	II	II	-
	TD-LI	II	EA	-	-	-	II	-	-
	-	-	EA	DT	GE	EA	II	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2. Traumatic/irritative treatment + IU	-	-	-	EA	-	-	-	-	-
	TD	-	LG-ce	-	-	EA	II A.s.	II A.s.	-
	TD	-	LG-ce	-	-	-	-	II	-
	TD	-	LG-ce	-	-	-	-	II	-
3. No previous treatment + IU	-	-	-	-	-	-	II	II	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4. GnRH Control IU saline	-	-	EA	-	-	EA	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5. Traumatic/irritative Control + IU saline	-	-	EA	-	-	-	-	-	-
	-	-	EA	-	-	-	-	II	-
6. <i>A. seminis</i> inoculation in the tail of the epididymis	TD	-	II A.s.	NA	NA	NA	II A.s.	II A.s.	A.s
	TD	AE	II	NA	NA	NA	II	-	-
	TD-LI	II	II	NA	NA	NA	II A.s.	-	-

*A.s* = positive *Actinobacillus seminis* isolation; - negative isolation.

TD = testicular degeneration; TD-LI = testicular degeneration with lymphocytic/plasmacytic infiltration; II=presence of inflammatory infiltrates (PMN, Lymphocytes, Macrophages); LG-ce granulomatous lesion with foreign body; GE = spermatic granuloma; EA = epithelial alterations (hyperplasia, cystic structures, metaplasia); - no pathological alterations; NA = not analyzed.

mientos de inoculación, incubación e identificación de las colonias sospechosas, en la misma forma descrita para las muestras de semen.

Para realizar las pruebas de IDD se produjo un antígeno soluble utilizando la cepa de referencia ATCC 15768 de *A. seminis*<sup>(16)</sup>. Las pruebas de IDD se efectuaron en un gel de agarosa al 0.5% en PBS a un pH de 7.2, la lectura se realizó a las 72 h<sup>(16)</sup>.

Los resultados de los estudios bacteriológicos, serológicos e histopatológicos, se presentan en los Cuadros 2 y 3. En epidídimos, las lesiones histopatológicas se caracterizaron por la presencia de hiperplasia epitelial con formación de quistes

contents included round spermatids, aberrant germinal meiosis multinucleated cells, and macrophages. In these cases testis' seminiferous tubules showed sloughing and necrosis of the germinal epithelium, incomplete meiosis multinucleated cells, scarce spermatids, and –due to the epithelial lesion– foamy cytoplasm Sertoli's cells were extremely evident. One Group 1 animal, showed a spermatic granuloma within the head of the epididymis with inflammatory mononuclear cells, lymphocytes, macrophages, and epithelioid cells around a compact mass of sperm cells. Nevertheless, no *A. seminis* was isolated from this lesion. Given that this type of lesion is extremely difficult to be clinically found, it could have had a congenital origin.

intraepiteliales, que cuando se inoculó directamente *A. seminis* en la cola del epidídimo, presentaron polimorfonucleares (PMN) en su interior. En algunos animales contrastaba el aspecto de los cortes del túbulo que se presentaban vacíos, con otros en que los espermatozoides estaban marcadamente compactados, sugiriendo la presencia de situaciones obstructivas en el órgano. En las cabezas del epidídimo se observaron en el contenido tubular espermátidas redondas, células multinucleadas de meiosis germinales aberrantes y macrófagos. En estos casos los túbulos seminíferos del testículo presentaron descamación y necrosis del epitelio germinal, células multinucleadas de meiosis incompletas, escasas espermátidas, y por la lesión epitelial eran muy aparentes las células de Sertoli con citoplasma espumoso. Un animal del Grupo 1, presentó en cabeza un granuloma espermático con células inflamatorias mononucleares, linfocitos, macrófagos y células epitelioides, alrededor de una masa de espermatozoides compactados, pero de la lesión no se aisló *A. seminis* y su origen pudo ser congénito, dada la dificultad de detectar clínicamente este tipo de alteraciones.

En los animales inoculados con etilenglicol y *A. seminis* (Grupo 2), se observó en las colas del epidídimo, metaplasia con epitelio cúbico plano no ciliado y compactación de espermatozoides en la luz tubular, sugerente de obstrucción. En tres de los animales, se presentaron granulomas caracterizados por la presencia de células gigantes en la región central, macrófagos y linfocitos e infiltrados perivasculares de mononucleares. En los testículos del mismo lado, ocurrieron cambios degenerativos del epitelio germinal. En las ámpulas del deferente se presentó infiltrado de macrófagos y linfocitos en la mucosa del conducto e infiltrado linfocitario en los acinos glandulares. En vesícula seminal se presentó infiltración leucocitaria con predominio de linfocitos y PMN en acinos (Figura 1), En contraste, en los controles que sólo se inocularon con etilenglicol (Grupo 5), las colas epididimales presentaron moderada hiperplasia de la mucosa y partes del túbulo con espermatozoides compactados, y no se presentaron lesiones en la cabeza del epidídimo, testículos y glándulas anexas.

La presencia de aislamientos y de lesiones se encontró con mayor frecuencia en las glándulas

The epididymis tails of animals inoculated with ethylene-glycol + *A. seminis* (Group 2), showed metaplasia with flat, non-ciliated, cubic epithelium, and sperm cell compaction in the tubular lumen, thus suggesting obstruction. Three animals showed granulomas characterized by the presence of gigantic cells in the central region, macrophages and lymphocytes, and perivascular mononuclear infiltration. Testis on the same side showed degenerative changes in the germinal epithelium. Macrophage/lymphocyte infiltration was found in the duct mucosa of the ampulla ductus deferens, with lymphocytic infiltration in the glandular acinus. In the seminal vesicle, leukocyte infiltration with lymphocyte and PMN preponderance was found in the acinus (Figure 1). In contrast, the epididymis tails of the ethylene glycol-inoculated controls (Group 5) showed moderate mucosal hyperplasia, and some parts of the tubule contained sperm cell compaction. No lesions were found in the head of the epididymis, testis, or accessory sex glands.

Isolations and lesions were more frequently found in the accessory glands of 3/14 animals challenged, including those that received bacterial inoculation directly in the epididymis. Bacterial isolation from

Figura 1. Vesícula seminal. Infiltración de células mononucleares en el estroma glandular. Hematoxilina-Eosina x100

Figure 1. Seminal vesicle. Mononuclear cell infiltration in the glandular stroma. Hematoxylin-Eosin x100



anexas, en 3 de los 14 animales desafiados, incluso en los animales que recibieron la inoculación directa de la bacteria en el epidídimo. El aislamiento a partir de muestras de semen, en 6 de los 14 animales, es la evidencia más importante de que la bacteria logró colonizar y mantenerse en el aparato reproductor.

Jansen<sup>(13)</sup> combinó el tratamiento con GnRH y la inoculación de *A. seminis* por vía uretral, en forma similar a lo realizado en los grupos 1 y 4, y logró aislar la bacteria en los dos borregos tratados, desde próstata, vesículas seminales y ampulla del deferente, y en uno de ellos la bacteria alcanzó la cola del epidídimo. Pero en un segundo experimento<sup>(16)</sup>, el mismo autor logró resultados diferentes, y atribuyó la falta de establecimiento del inóculo a la sobre dosificación hormonal. En este trabajo, la posible sobre dosificación hormonal, las características de los animales inoculados y la cepa de desafío, pudieron ser variables que impidieron el establecimiento y recuperación de la bacteria. Sin embargo, en tres de los borregos se presentaron alteraciones en los epidídimos, algunos con aislamiento positivo de bacterias diferentes de *A. seminis*. El tratamiento pudo favorecer la implantación de *A. seminis* y de otras bacterias, con la posible eliminación competitiva de *A. seminis* o la falla en su aislamiento, aunque las lesiones sugieren que sí ocurrió el establecimiento de la bacteria de desafío. Diversos trabajos en el tema indican la presencia de lesiones características de la enfermedad con y sin aislamiento de bacterias; también se reporta el aislamiento de la bacteria sin que se observen lesiones<sup>(17)</sup>.

Las lesiones en la cola del epidídimo izquierdo, donde se realizó el tratamiento traumático irritativo, resultaron bacteriológicamente negativas. Es posible que la intensidad de la respuesta inflamatoria inducida por el etilenglicol haya impedido el establecimiento de *A. seminis*.

El hecho de aislar la bacteria de semen de animales que no presentaron lesiones en el aparato reproductor, sugiere la permanencia de la bacteria en prepucio o en el extremo de la uretra, sin lograr la colonización hacia otros órganos. Se ha aislado *A. seminis* del semen, sin que existan lesiones

semen samples of 6/14 animals is a paramount evidence of bacterial colonization/permanence in the reproductive tract.

Jansen<sup>(13)</sup> combined GnRH treatment with urethral *A. seminis* inoculation, similar to our Groups 1 and 4. This author was able to isolate the bacterium from the prostate, seminal vesicles, and ampulla ductus deferens of treated sheep. In one of these animals, the organism reached the tail of the epididymis. Nevertheless, in a second experiment<sup>(16)</sup>, the same author obtained different results. He attributed colonization failure to hormone overdose. In this research, potential hormone overdose, animal traits, and challenge strain characteristics could have been variables preventing the establishment and re-isolation of the organism. Nevertheless, three of our sheep showed epididymal alterations, and non-*A. seminis* isolates were positively obtained. Treatment could have promoted colonization with *A. seminis* together with other bacteria, with the potential competitive exclusion of *A. seminis*, resulting in no *A. seminis* recovery. Nonetheless, lesions suggest that colonization with the challenge organism did occur. Several different publications on this topic showed the presence of characteristic lesions of this particular disease, with and without bacterial isolation. Bacterial isolation with no lesions has also been reported<sup>(17)</sup>.

Left epididymis tail lesions –in those animals were traumatic/irritative treatment was performed– yielded negative bacteriological results. The intense ethylene glycol-induced inflammatory response may have prevented *A. seminis* colonization.

Bacterial isolation from the semen of animals with no lesions in the reproductive tract suggests bacterial permanence in the prepuce or in the urethral end, with failure to colonize other organs. *A. seminis* has been isolated from semen samples of animals with no palpable lesions in their genitals, and with no inflammatory cells in their semen<sup>(10,15,18)</sup>. Searson<sup>(19)</sup> isolated *E. coli* and *A. seminis* from the ampullae ductus deferens, and seminal vesicles, with no pathological lesions.

All animals in Group 6 showed inoculation site inflammatory lesions<sup>(3,5)</sup>. In these and other similar



palpables en los genitales, ni células inflamatorias en el semen<sup>(10,15,18)</sup>. Searson<sup>(19)</sup> aisló *E. coli* y *A. seminis* de las ámpulas del conducto deferente y las vesículas seminales sin presencia de patología.

En el Grupo 6, todos presentaron lesiones inflamatorias en el lugar de inoculación<sup>(3,5)</sup>. En estos trabajos y en otros semejantes, la inducción de lesiones en la cola del epidídimo es consistente, posiblemente asociada a los fenómenos auto inmunes, pero en contraparte se señalan las fallas para recuperar la bacteria de desafío<sup>(3,5)</sup>. En los resultados obtenidos de esos trabajos, así como los obtenidos en el presente estudio, en los animales irritados con etilenglicol y en los inoculados por vía IE, apuntan a que la intensidad de las lesiones granulomatosas pueden dificultar en extremo los aislamientos.

Los hallazgos histopatológicos en testículos y epidídimos, fueron coincidentes con los encontrados en las reproducciones experimentales de la enfermedad, y en los casos de campo reportados por otros autores<sup>(7,8)</sup>.

La presencia de infiltrados inflamatorios rodeando el deferente en el ámpula, en los tres carneros de los que se recuperó *A. seminis*, sugiere la respuesta a las bacterias o a sus antígenos presentes en la luz canalicular<sup>(20)</sup>.

La localización de las lesiones en las vesículas seminales es acorde con la inoculación del patógeno a través de la uretra, por reflujo seminal y ascenso desde el prepucio<sup>(20)</sup>.

Los resultados de la serología mostraron reacciones positivas en 2 de 3 animales inoculados por vía intraepididimal y en 2 de 11 de los inoculados por vía intrauretral. Se encontraron reacciones dudosas en 1 de 3 de los inoculados por vía intraepididimal y en 3 de 11 de los inoculados por vía intrauretral. En otros estudios<sup>(16)</sup>, se describieron reacciones cruzadas caracterizadas por bandas de precipitación, pero no de identidad con *H. somnus* y *Mannheimia haemolytica*.

La prueba de ELISA utilizando LPS como antígeno, logró detectar anticuerpos contra *A. seminis* desde los 11 días posinoculación, cuando la inoculación

studies, epididymis lesions have been consistently induced. This is possibly associated with autoimmune phenomena but, on the other hand, the challenge organism could not be recovered<sup>(3,5)</sup>. Results from this and other studies using ethylene glycol-irritated animals and IE-inoculated animals suggest that the intense granulomatous lesions can yield bacterial recovery extremely difficult. Histopathological findings in testis and epididymis were consistent with those found in studies where the disease has been experimentally reproduced, as well as with field cases reported elsewhere<sup>(7,8)</sup>.

Inflammatory infiltrates around the ampulla ductus deferens of the three rams from which *A. seminis* was recovered, suggest response to the bacteria or to the bacterial antigens present in the canalicular lumen<sup>(20)</sup>.

Semen vesicle lesions are consistent with urethral inoculation of the pathogen, by seminal reflux and upward movement from the prepuce<sup>(20)</sup>.

Positive serological results were obtained in 2/3 IE-inoculated animals, and in 2/11 IU-inoculated animals. Questionable reactions were found in 1/3 IE-inoculated animals and in 3/11 IU-inoculated animals. Other reports<sup>(16)</sup> described cross reactions characterized by precipitation bands, but no identity with *H. somnus* or *Mannheimia haemolytica* was found.

ELISA test using lipopolysaccharide (LPS) antigen detected *A. seminis* antibodies starting 11 d after experimental inoculation<sup>(21)</sup>. Even though, it has also been reported that only 15 % sheep shedding *A. seminis* in the semen are positive to the ELISA test<sup>(21)</sup>.

Some animals shedding *A. seminis* in the semen can result negative to the FC test<sup>(9,17)</sup>. This was also observed in the DID test with a soluble antigen<sup>(16)</sup>. The low serological detection rate of sub clinical cases can be attributed to lack of an intense, persistent IgG humoral response, resulting from a low intensity, local, intra-canalicular inflammatory process, with no tissue invasion or bacteremia<sup>(3,22, 23)</sup>. The arrival of organisms (either *A. seminis* or others) to different reproductive tract sections has been explained by bacterial upward movement from the prepuce and urethra by

experimental se realizó por vía IE<sup>(21)</sup>. Sin embargo, también se ha reportado que solamente un 15 % de los borregos que eliminan *A. seminis* en semen resultan positivos a la prueba de ELISA<sup>(21)</sup>.

Algunos animales que eliminan *A. seminis* en semen pueden resultar negativos a la prueba de FC<sup>(9,17)</sup>, esto también fue observado para la prueba de IDD con antígeno soluble<sup>(16)</sup>. La baja detección de los casos subclínicos en las pruebas sexológicas, puede ser atribuida a la ausencia de una respuesta humoral intensa y persistente por IgG, debido a la producción de un proceso inflamatorio local e intracanalicular de baja intensidad, con ausencia de invasividad tisular y bacteremia<sup>(3,22,23)</sup>. La llegada de las bacterias, *A. seminis* u otras, a los distintos sectores del aparato reproductor, se ha explicado por el ascenso desde el prepucio y la uretra mediante flujo seminal retrógrado con ausencia de bacteremia<sup>(11)</sup>.

Los resultados de este trabajo muestran que las infecciones por *A. seminis* son difíciles de establecer en condiciones experimentales y sugieren que la epididimitis de este origen requiere de otros factores coadyuvantes para poder establecerse, entre los que se podrían considerar la susceptibilidad individual de los animales, cambios funcionales en el aparato reproductor, otras patologías asociadas, cambios en la microflora prepucial, y depresión de la respuesta inmune. Sin embargo se constataron lesiones en distintos sectores del epidídimo en los animales tratados con GnRH, sin lograrse el aislamiento de la bacteria como lo observado por Al-Katib y Dennis<sup>(24)</sup>; lesiones que son atribuidas a la bacteria, ya que no existían previas al desafío.

Se concluye que los métodos probados para reproducir el cuadro de epididimitis, no permitieron resultados consistentes, y sugieren el carácter multifactorial de la enfermedad. Las glándulas anexas pueden ser un importante sitio de refugio de la bacteria.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por los proyectos PAPIIT IN 206101 y SEP CONACYT 40937. El

retrograde seminal flow, in the absence of bacteremia<sup>(11)</sup>.

Results of this research show that the experimental *A. seminis* infection is difficult to obtain, suggesting that epididymitis of this origin requires other coadjutor factors for the organism to colonize, including animal individual susceptibility, reproductive functional changes, other associated pathologies, changes in the prepucial flora, and depressed immune response. Nevertheless –similar to the study reported by Al-Katib and Dennis<sup>(24)</sup>– lesions were detected in different epididymis sectors of GnRH-treated animals but organism isolation attempts failed. Given that these lesions did not exist prior to challenge, they were attributed to the organism.

It is concluded that the methods used to attempt reproduction of the epididymitis conditions, did not yield consistent results, thus suggesting a multi-factorial character of the disease. Accessory sex glands can be an important site to harbor the organism.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research was financed by the following projects: PAPIIT IN 206101 y SEP CONACYT 40937. The first author received SRE and DGEP-UNAM scholarships for his graduate studies. Gratitude is expressed to Germán Garrido, DVM for preparing histopathology sections.

*End of english version*

---

primer autor recibió becas para sus estudios de posgrado, de la SRE y de la DGEP-UNAM. Se desea agradecer al MVZ. Germán Garrido por la realización de los cortes histopatológicos.

## LITERATURA CITADA

1. Walker RL, Leamaster BR, Stellflug JN, Biberstein EL. Association of age of ram with distribution of epididymal lesions

## INDUCCIÓN EXPERIMENTAL DE EPIDIDIMITIS EN OVINOS

- and etiologic agent. J Am Vet Med Ass 1986;188:393-396.
2. Appuhamy S, Coote JG, Low JC, Parton R. PCR methods for identification and characterization of *Actinobacillus seminis* stains. J Clin Microbiol 1998;36:814-817.
  3. Baynes ID, Simmons GC. Ovine epididymitis caused by *Actinobacillus seminis*. Aust Vet J 1960;36:454-459.
  4. Ekdahl MO, Money DFL, Martin CA. Some aspects of epididymitis of rams in New Zealand. N Z Vet J 1968;16:81-82.
  5. Livingston CW, Hardy WT. Isolation of *Actinobacillus seminis* from ovine epididymitis. Am J Vet Res 1964;25:660-663.
  6. Trejo GO, Zuñiga O, Alvarez MCI, Tórtora PJJ. Epididimitis producida por bacilos pleomórfico Gram negativos. (Presumiblemente *Actinobacillus seminis*). En: Memorias del XII Congreso nacional de Buiatría. Tampico, Tamaulipas. México. 1986:24-27.
  7. Heath PJ, Davies JH, Morgan, Aitken IA. Isolation of *Actinobacillus seminis* from rams in the United Kingdom. Vet Rec 1991;129:304-307.
  8. De la Puente-Redondo VA, García BN, Pérez MC, González RMC, Rodríguez FEF, Gutiérrez MCB. Isolation of *Actinobacillus seminis* from the genital tract of rams in Spain. J Comp Pathol 2000;122:217-222.
  9. Simmons GC, Baynes BV, Ludford B. Epidemiology of *Actinobacillus seminis* in a flock of Border Leicester sheep. Aust Vet J 1966;42:183-187.
  10. Low JC, Somerville D, Mylne JA, Mckelvey WAC. Prevalence of *Actinobacillus seminis* in the semen of rams in the United Kingdom. Vet Rec 1995;136:268-269.
  11. Jansen BC. The epidemiology of bacterial infection of the genitalia in rams. Onderstepoort J Vet Res 1983;50:275-282.
  12. Bulgin MS, Bruss ML, Anderson BC. Methods for control of lamb epididymitis in large purebred flocks. J Am Vet Med Ass 1990;196:1110-1115.
  13. Jansen BC. The aetiology of rams epididymitis. Onderstepoort J Vet Res 1980;47:101-107.
  14. Miles AA, Misra SS, Irwin JO. The estimation of the bactericidal power of the blood. J Hyg 1938;38:732-734.
  15. Van Tonder EM. *Actinobacillus seminis* infection in sheep in the Republic of South Africa I. Identification of the problem. Onderstepoort J Vet Res 1979;46:129-133.
  16. Méndez NG, Díaz AE, Morales JF, Aguilar RF, Suárez GF. Epididimitis ovina: estudios bacteriológicos y serológicos. Vet Mex 1999;30:329-336.
  17. De Wet JAL, Erasmus JA. Epididymitis of rams in the Central and Southern districts of the Orange Free State. J S Afr Vet Ass 1984;55:173-179.
  18. Van Tonder EM. *Actinobacillus seminis* infection in sheep in the Republic of South Africa. II. Incidence and geographical distribution. Onderstepoort J Vet Res 1979;46:135-140.
  19. Searson JE. Sensitivity and specificity of two microtitre complement fixation test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. Aust Vet J 1982;58:5-7.
  20. Foster RA, Ladds PW, Briggs GD, Hoffmann D. Pathology of the accessory sex glands of rams infected with *Brucella ovis*. Aust Vet J 1987;64:248-250.
  21. Tekes L, Hajtos I. Trials with an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the diagnosis of subclinical genital infections in rams caused by *Histophilus ovis* and *Actinobacillus seminis*. J Vet Med B 1990;37:549-555.
  22. Jansen BC, Hayes M. Immunity against genital infection by *Histophilus ovis* in rams. Onderstepoort J Vet Res 1984;51:203-207.
  23. Alsenosy AM, Dennis SM. Pathology of acute experimental *Actinobacillus seminis* mastitis in ewes. Aust Vet J 1985;62:234-237.
  24. Al-Katib WA, Dennis SM. Experimental transmission of *Actinobacillus seminis* infection to rams. Vet Rec 2005;157:143-147.

