

VIABILIDAD DE *MYCOPLASMA AGALACTIAE* Y *MYCOPLASMA MYCOIDES* SUBSP. *CAPRI* EN DOSIS SEMINALES DE MACHO CABRÍO

Gómez-Martín, A.¹, Gadea, J.², Rabal, F.³, De Ondiz, A.², Vieira L.A.², Sánchez, A.¹ y De la Fe, C.¹

¹Grupo de Investigación Sanidad de Rumiantes. Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. 30100 Murcia. España. E-mail: cdeafe@um.es

²Departamento de Fisiología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. 30100 Murcia. España

³ACRIMUR, Centro de Selección y Mejora Genética de la Raza Murciano-Granadina. Lorca. Murcia. España.

INTRODUCCIÓN

Entre las enfermedades infecto-contagiosas que afectan de forma endémica a la cabaña caprina española, la agalaxia contagiosa (AC) es una de las enfermedades con mayor repercusión socio-económica ocasionando pérdidas directas e indirectas difícilmente evaluables (Corrales et al., 2007). En la actualidad, muchos aspectos relacionados con la epidemiología de la enfermedad permanecen sin aclarar, incluyendo entre ellos, el papel real que pueden desempeñar los sementales en la transmisión y mantenimiento de la enfermedad en los colectivos caprinos.

Diversos trabajos realizados en los últimos años han demostrado la presencia de un número elevado de sementales caprinos que son portadores auriculares de *Mycoplasma* (*M.*) *agalactiae* y *M. mycoides* subsp. *capri* (Mmc) y no presentan síntomas de enfermedad (portadores asintomáticos) (De la Fe et al., 2010). Además, la mayor parte de estos portadores eran serológicamente negativos, un factor previamente observado sólo en algunos colectivos de cabras estudiadas (De la Fe et al., 2005).

En todos estos animales portadores asintomáticos ha podido constatarse la presencia de ambas especies de micoplasma en diversas localizaciones orgánicas internas que han sido sometidos a un estudio microbiológico completo (Gómez-Martín et al., 2008). En este sentido, estudios posteriores confirmaron la presencia de micoplasmas en el aparato respiratorio y en el aparato genito-urinario de varios de los sementales infectados (De la Fe et al., 2010), y la primera descripción de *M. agalactiae* en el semen de varios animales infectados de modo natural (De la Fe et al., 2009). Estos datos confirman la difusión de estos microorganismos en otras localizaciones anatómicas del animal, un hecho importante a la hora de considerar su posible participación en la transmisión.

Todos los datos obtenidos, parecen sugerir la posibilidad real de la participación de los sementales en la transmisión de la enfermedad a través de la eliminación de estos microorganismos en diferentes secreciones, incluyendo la muestra de semen, lo cual podría tener una repercusión importante en la difusión de la enfermedad. El primer paso para confirmar esta hipótesis y valorar la posible importancia de la vía seminal es estudiar el comportamiento de estas bacterias en el semen, al objeto de evaluar su supervivencia en el mismo. El presente trabajo evalúa la viabilidad de *M. agalactiae* y Mmc en muestras de dosis seminales de machos cabríos inoculadas experimentalmente con ambas especies de micoplasma.

MATERIAL Y METODOS

En este estudio se han empleado un total de 7 eyaculados obtenidos de 5 sementales de raza Murciano-Granadina. Cada uno de los eyaculados fueron obtenidos mediante la utilización de vagina artificial y fueron diluidos en un medio preparado a base de leche desnatada hasta alcanzar la concentración final de 200 millones de espermatozoides/mL, fueron enfriados de forma progresiva y se mantuvieron a 4 °C hasta 10 minutos antes de su inoculación experimental, momento en el cual se colocaron a temperatura ambiente. En ese momento, se preparó un pool con muestras seminales de varios animales y tras homogeneizar, se procedió a distribuir en eppendorf estériles 3 alícuotas de 1,5 ml. Una alícuota fue inoculada con 10⁷ UFC/ml (40 µl) de *M. agalactiae* (cepa PG2), otra alícuota con 10⁷ UFC/ml (40 µl) de Mmc (cepa Y-goat) y a la tercera alícuota se añadió 40 µl de medio de

cultivo de micoplasmas (Kirchhoff y Rosengarten, 1984), sirviendo de control. El volumen restante se destinó a la realización de los controles microbiológicos (inoculación en agar sangre y medio específico para micoplasmas, extracción de ADN y detección por PCR de *Mycoplasma* spp.).

Las tres alícuotas fueron incubadas a 37°C, temperatura ideal para el crecimiento de estos microorganismos utilizando un bloque calefactor (Eppendorf). Se procedió a cuantificar la presencia de micoplasmas en cada alícuota en los siguientes tiempos: 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120 y 150 minutos, realizándose igualmente la determinación del pH. Para la cuantificación se utilizó el método de dilución seriada descrito por Albers y Fletcher (1982), utilizando placas de microtitulación y medio para micoplasmas en agar (Kirchhoff y Rosengarten, 1984) a partir de 50 µl de cada muestra de semen y por duplicado. Las placas se incubaron un total de 48 horas a 37°C, en atmósfera húmeda y 5% de CO₂. Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente con posterioridad, evaluándose el efecto del tratamiento, del tiempo y la interacción de ambos (SAS). Todo este procedimiento fue repetido en tres ensayos diferentes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La cuantificación de los micoplasmas permitió realizar la curva de viabilidad de cada especie a lo largo del tiempo (Figura 1). En el caso de *M. agalactiae*, observamos un descenso significativo en su concentración ($P < 0,05$) a partir de los 30 minutos de ensayo (de 7,94 a 7,38 log UFC/ml), mientras que en el caso de Mmc, el descenso comienza a ser significativo a partir de los 45 minutos (de 7,72 a 6,99 log UFC/ml). Este descenso inicial en la concentración bacteriana podría deberse a la reducción del pH del medio en el que se desarrolla el estudio, ya que el medio de cultivo de micoplasma presenta pH 7,4 y el de la dosis seminal pH 6,0. Este hecho, podría originar la muerte de las poblaciones bacterianas menos adaptadas a dichos cambios, dada la sensibilidad de estos microorganismos carentes de pared celular a los cambios externos del medio y a la acidificación del mismo (Howard y Gourlay, 1978).

Posteriormente, se observó la estabilización de la concentración de ambos microorganismos a lo largo del tiempo y hasta la finalización del ensayo, oscilando la misma entre 6,95 y 7,10 log UFC/ml en el caso de Mmc, y entre 7,04 y 7,124 log UFC/ml en el caso de *M. agalactiae*. En este sentido, este periodo se caracteriza por la estabilización del pH en ambos casos, oscilando los valores entre 6 y 6,25 a partir de los 60 minutos. Es interesante mencionar que los valores de pH registrados en la muestra control son similares a los observados en las muestras inoculadas lo que parece sugerir que la presencia de ambos microorganismos no produce cambios en el pH extracelular como consecuencia del metabolismo microbiano.

No obstante, a pesar del descenso significativo en la concentración de ambas especies, los resultados confirman que *M. agalactiae* o Mmc podrían mantenerse viables y en altas concentraciones en muestras de semen caprino fresco durante al menos 2 horas y media tras la preparación de la dosis seminal. Esto puede sugerir que si en las muestras seminales están presentes los micoplasmas podrían mantenerse viables en concentraciones similares en la dosis seminal por lo que las repercusiones de este posible fenómeno deben ser estudiadas en profundidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albers, C.A., Fletcher, R.D., 1982. *Appl Environ. Microbiol* 43: 958-960
- Corrales, J.C., Esnal, A, De La Fe, C, Sánchez, A, Assunção, P, Poveda, J.B., Contreras, A. 2007. *Small Rum Res* 68: 154–166.
- De La Fe, C., Assunção P., Rosales, R.S., Antunes, T., Poveda, J.B. 2005. *Vet J* 170: 257-259.
- De La Fe, C., Amores J., Martín AG., Sánchez A., Contreras A., Corrales, J.C. 2009. *Theriogenology* 72: 1278-1281
- De la Fe, C., Gómez Martín, A., Amores, J., Corrales, J.C., Sánchez, A., Poveda, J.B., Contreras, A. 2010. *Vet J* 186: 113-115.
- Gómez-Martín, A., Corrales, J.C., Sánchez, A., Amores, J., Martínez-Parra, J., Contreras, A., De La Fe, C. 2008. *Producción ovina y caprina* 29: 318-323.
- Howard,

C.J., Gourlay, R.N. 1978. *Sci Prog Oxf* 65: 313-329 • Kirchoff, H., Rosengarten, R. 1984 *J Gen Microbiol* 130: 2439-2445 •

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por la Fundación SENECA, Agencia Regional de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia (Proyecto número 11785/PI/09). Ángel Gómez-Martín disfruta de una beca predoctoral FPU de la Universidad de Murcia.

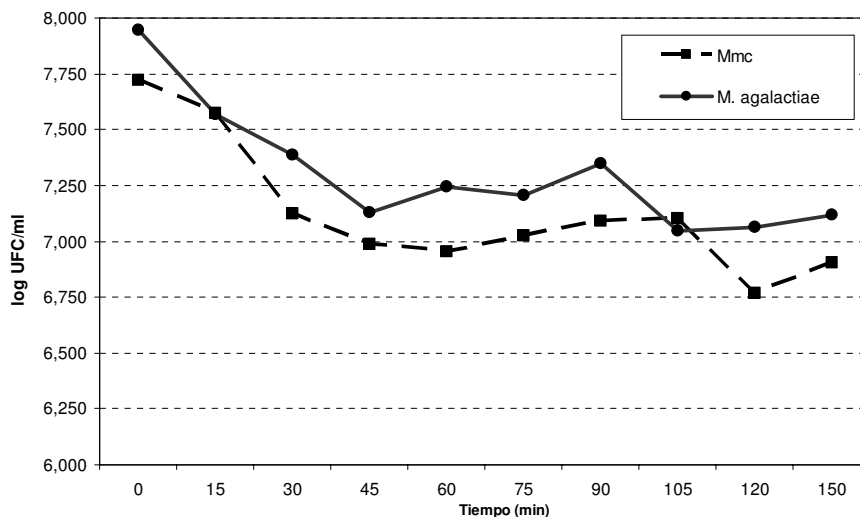


Figura 1. Valores medios del logaritmo de la concentración de micoplasmas (UFC/ml) en función de la especie y el tiempo en dosis seminales de machos cabríos

VIABILITY OF *MYCOPLASMA AGALACTIAE* AND *MYCOPLASMA MYCOIDES* SUBSP. *CAPRI* IN FRESH GOAT BUCK SEMEN SAMPLES

ABSTRACT: This study was designed to determinate the viability of *Mycoplasma agalactiae* (Ma) and *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (Mmc), the two species most frequently involved in contagious agalactia, in seminal doses from goat bucks. Samples were inoculated and maintained at 37 °C. After 30 minutes of incubation, a total of 24 determinations were conducted for each mycoplasma species and storage times (0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 150 minutes). Our findings reveal an initial and significant decrease in the UFC/ml of both mycoplasma species during the first 30 minutes for Ma (7,94 to 7,38log UFC/ml) and 45 minutes for Mmc (7,72 to 6,99 log UFC/ml) followed by a period time of sustained viability of *M. agalactiae* and Mmc under the conditions examined (2.5 h).

Keywords: *M. agalactiae*, *M. mycoides* susp. *capri*, fresh semen, viability.