



PRESENCIA DE *B. ovis* EN SEMEN DE CARNEROS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE SOMETIDOS A ESTRÉS CONTROLADO.

Garrido-Fariña German I.¹, Gutiérrez Hernández J. L.¹, Morales Álvarez J. F.⁴, Díaz-Aparicio Efrén⁴, Romero Ramírez C. M.³, Tortora Pérez Jorge L.^{2*}

OBJETIVO GENERAL. Evidenciar en carneros infectados experimentalmente, la presencia de *B. ovis* en el semen, para demostrar la correlación entre el estrés generado por el manejo de rutina y la jerarquía social, sobre la susceptibilidad a la infección experimental.

INTRODUCCIÓN. Las respuestas de los organismos a los estímulos estresantes promueven cambios en la etología individual y de grupo, así como diferentes respuestas fisiológicas que tienen la finalidad de mejorar la adaptación y aumentar la supervivencia. Bajo condiciones de estrés el aparato reproductor se pueden ver afectado, cuando las condiciones de manejo de un rebaño cambian estacionalmente, durante la época de inducción y empadre, estos periodos inducen inmunodepresión por la generación crónica de cortisol y sus consecuencias sobre el arco hipofisis-hipotálamo-adrenales-gónadas. Los ovinos son una de las especies domésticas que presenta gran reactividad a estímulos estresantes de intensidad moderada. Dentro del manejo experimental se han generado modificaciones fisiológicas y conductuales mediante la combinación de animales dominantes con sumisos. Las enfermedades infecciosas de los animales domésticos han sido relacionadas con condiciones de estrés generadas por el manejo inadecuado y factores medioambientales, de manejo, alimentación y principalmente los relacionados a cambios hormonales durante la maduración sexual se han asociado con la predisposición a epididimitis infecciosa del carnero (EIC). Una de las entidades infectocontagiosas más importantes dentro de las explotaciones ovinas es la EIC, provocada por *Brucella ovis*, una bacteria G- con distribución mundial con características de patógeno intracelular facultativo.

METODOLOGÍA. El presente trabajo se realizó en la unidad de aislamiento del INIFAP microbiología en Palo alto, DF. El manejo de los animales fue aprobado por el órgano colegiado del Posgrado en producción y salud animal de la UNAM, México y observó las NOM para manejo de animales para experimentación. 24 carneros mayores a 2 años de edad, sin antecedentes de epididimitis y negativos a *B. ovis*, *A. seminis* e *H. somni*. La jerarquía del rebaño se midió mediante la tasa de dominancia (TD), esta condición etológica es una razón entre la capacidad que tiene un animal para "ganar" durante un evento agonista, esto es, cualquier situación que involucre a dos animales y los enfrenta. Grupo I infección experimental control químico dexametazona dominancia baja (n=6); grupo II infección experimental dominancia alta (n=6); grupo III infección experimental dominancia moderada (n=6); grupo IV infección experimental control positivo inoculación intraepididimal dominancia alta (n=3); grupo V animales testigo sin infección un animal representativo de los tres niveles de dominancia (n=3). La infección experimental de los carneros se realizó por la inoculación con un cultivo de *B. ovis* con 4.7×10^9 UFC., mediante instilación conjuntival e infiltración intraepididimal con 0.5 ml en cada una para el grupo control de infección inoculación intraepididimal con 0.5 ml. La seroconversión se monitoreó mediante inmunodifusión en gel de agarosa (IDD) y se inició el sacrificio escalonado a los 30 días postinoculación (PI), terminando a los 94 días PI. La técnica de PCR se empleó para evidenciar la presencia de DNA bacteriano, *B. ovis*, y *Actinobasillus seminis*, en el semen, A partir de muestras de eyaculado postinoculación de 100µl por animal, se extrajo el DNA con el Kit Multiplex, de Quiagen, de acuerdo a las instrucciones del fabricante, y se corrió con las constantes de termociclado recomendadas y con las secuencias empleadas por Saunders et al 2007, los productos de la PCR se corrieron en gel de agarosa al 1%, de acuerdo al marcador de peso molecular se observaron bandas para *B. ovis* de 690 pb, tanto en el control como en los animales infectados. Se observaron las poblaciones linfocitarias (CD4+, CD8+) en los diferentes órganos y tejidos del tracto reproductor. Las diferencias se evidenciaron con la prueba de Fisher para diferencias mínimas significativas con el programa Statgraphics Plus 5.0 para Windows. Considerando $P < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN. De 21 carneros inoculados 13 animales fueron positivos por IDD, 8 nunca fueron positivos y los 3 carneros testigo sin infección nunca fueron positivos a lo largo del experimento, a los 10 días PI se detectó seroconversión de los primeros carneros por IDD, alcanzando la máxima cantidad de animales positivos a los 27 días PI. Mediante PCR se encontraron productos con peso molecular para la banda de *B. ovis*, en 7 animales: 2 de jerarquía alta, 1 de jerarquía media y 3 de baja. En los animales positivos se observaron lesiones macroscópicas características de la epididimitis granulomatosa. Los animales de jerarquía alta presentaron mayor daño que los de jerarquía media, pero este último grupo presentó mayor infiltración. Los animales de jerarquía media presentaron mayor cantidad de CD4+ y los grupos de dominancia alta y sumisos no exhibieron diferencia significativa entre ellos. Se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las cantidades de linfocitos CD8+ del grupo de dominancia media contra dominantes y sumisos, entre los animales dominantes y sumisos no hay diferencia significativa.

Cantidad de células CD4+ y CD8+ en los órganos del sistema genitourinario por grupos de dominancia.

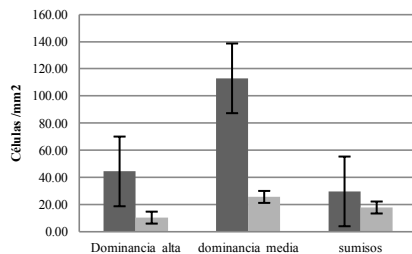


Figura 2. Células CD4+ y CD8+ en los órganos del sistema genitourinario, agrupando al rebaño por tasa de dominancia.

Infiltración en los grupos experimentales.

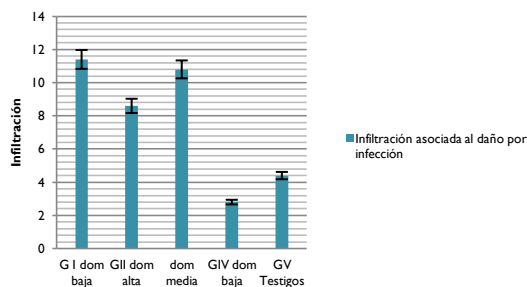


Figura 2. Infiltración promedio presentada en los órganos del sistema genitourinario, en los grupos experimentales.

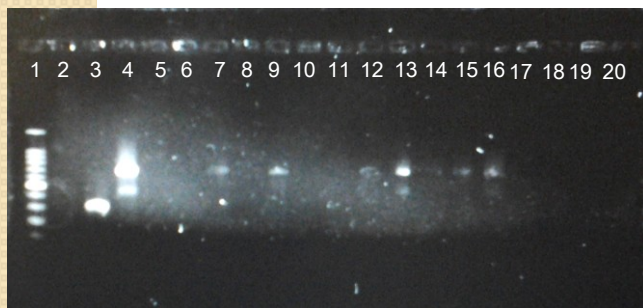


Figura 1. Gel de agarosa en el que se corrieron los productos finales de la PCR. En el carril 1 marcador de peso molecular, carril 3 DNA control para *A. somni*, carril 4 DNA control para *B. ovis*. Se pueden comparar el peso molecular del control de *B. ovis*, contra los animales positivos, en los carriles 7, 9, 12, 13, 14, 15 y 16. En el carril 20 se corrió el control negativo. No se presentan animales positivos para *A. somni*.

CONCLUSIÓN. Las modificaciones ocasionadas en el tracto genitourinario por un evento estresor controlado, tienen correlación positiva con la susceptibilidad de los animales frente a la infección experimental. Las fluctuaciones observadas en las poblaciones celulares del tracto reproductor, se pueden relacionar con las modificaciones provocadas por el cortisol generado en los animales de jerarquía alta y media, provocadas durante un estímulo estresante. En la brucelosis ovina o epididimitis infecciosa se ha observado que en presencia de la bacteria, los animales dominantes del rebaño con una gran capacidad de reacción frente a los estresores generados durante la época reproductiva, son los que presentan lesiones más aparentes y agudas, mientras que los animales de dominancia media aunque son positivos serológicamente, pueden mantenerse como portadores durante mucho tiempo, presentando lesiones discretas. Por lo que si el individuo es manipulado de acuerdo a su jerarquía dentro del rebaño y se mantienen las relaciones afiliativas del núcleo social que pertenece, podrá hacer frente a las consecuencias de los estresores inherentes a la explotación intensiva, durante periodos de tiempo más prolongados y en presencia de agentes patógenos como *Brucella ovis* o de flora natural como *Actinobacillus* e *Histophilus*.

¹Laboratorio de apoyo a Histología y Biología, Sección de ciencias morfológicas. ²Sección de patología y análisis clínicos. Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán. UNAM. Km. 2.5 carretera Cuautitlán-Teoloyucán. Cuautitlán Izcalli, Estado de México. CP 54712. UNAM. ³Depto de Biología de la Reproducción. UAM Iztapalapa. ⁴CENID-Microbiología, INIFAP SAGARPA.

isaurogafa@yahoo.com.mx, tortora@unam.mx.

