



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**“FRECUENCIA DE MICOPLASMAS EN EL APARATO REPRODUCTOR DE
EQUINOS”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS EN LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL**

**PRESENTA:
MARTHA TRINIDAD JUÁREZ CORTÉS**

**TUTOR:
DR. FRANCISCO J. TRIGO TAVERA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA-UNAM**

**MIEMBROS DE COMITÉ TUTOR:
M en C. LAURA JARAMILLO MEZA
CENID-MICROBIOLOGÍA INIFAP**

**DRA. ROSA ELENA MIRANDA MORALES
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA-UNAM**

MÉXICO D. F. SEPTIEMBRE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso


DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL


Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.


Dedicatorias

A los grandes ejemplos en mi vida:


 **Mis abues:** Don Ricard†, Doña Cira y Doña Sarita

 **Gina†** Campos Maza: “Nena” donde quiera que te encuentres sé que estarás orgullosa de lo formaste

 **A mi papito†**


 **A mi mamita:** por ser mi apoyo, mi amiga, sin ti... no lo hubiera logrado, te amo, te respeto y es un orgullo ser tu hija

 **A mi familia,** tí@s, prim@s y sobri@s

 **A mis ahijad@s:** porque quiero que sigan este camino

 **A mis profesores**

 **A mis amigos**

 **A mis colegas**

Muchas gracias a la vida que me dejó llegar a este momento

Soy feliz

Agradecimientos

Al **Dr. Francisco Trigo Tavera**, por su apoyo e interés durante la realización de este proyecto.

A la **Dra. Rosa Elena Miranda Morales**, por dejarme aprender una vez más a su lado, conocer y querer más a este gran mundo de la ciencia.

A la **Dra. Laura Jaramillo Meza**, por enseñarme a mejorar en todos los aspectos, por el apoyo y paciencia, le agradezco infinitamente.

A los honorables miembros del Jurado:

- 🌐 Dra. Elizabeth Morales Salinas
- 🌐 Dra. Ana Myriam Boeta Acosta
- 🌐 Dr. Víctor Rubén Tenorio Gutiérrez
- 🌐 Dr. Francisco Aguilar Romero

Por su tiempo invertido en la revisión y análisis del escrito, también por sus comentarios y observaciones para mejorar la calidad de la tesis

A la **MVZ. Grisel Anaya**, por su apoyo en la estancia en su Laboratorio y en la prueba de tarjeta para *Brucella abortus*.

Al **MVZ. Daniel Atilano**, por su colaboración en la enseñanza de la técnica de Micro aglutinación Microscópica para *Leptospira interrogans*.

A los **profesores** que me impartieron clases: Arantza Lassala, Raúl Ulloa, Graciela Tapia, Samanta Romero, Laura Romero, Myriam Boeta, Antonio Verdugo, Alfredo Castañeda, Xóchitl Vega.

Al equipo del laboratorio de Micoplasmas: Verito, Mar, Fabis, Tani, Cuau, Uli, Joselin, Tona y Lili.

A los MVZ's: Alain Martínez, Sara Pelayo, Manuel Solís, Sergio Hayen, Jersain Montiel, Antonio Esquivel, Myriam Boeta, Eduardo Morones, Alberto García, por sus atenciones y conocimientos para la toma de muestra.

A Pascual Ramírez, por todos sus conocimientos compartidos en este proyecto. Así como, a esos buenos amigos: Nina, Moni, Rosy, Lupita, Claus, Lázaro, Karlita, Karina, Raulito (amore), Raulito (prácticas de bacteriología), Alain, Marianita, Abraham, Jaqui, Gerardo, Rosalía, Cristina, Jorge, Peter y Don Mario.

Al Departamento de Microbiología e Inmunología, principalmente al Lab. de preparación de medios y reactivos, y a todo el personal académico y administrativo, que directa o indirectamente contribuyeron a la realización de este trabajo.

Al apoyo de beca **CONACYT:** 285937

A los proyectos PAPIIT IN-222412-3 y PAPIIT IN-219909-3, DGAPA UNAM; para el financiamiento de este proyecto

A la UNAM, por sus programas de actualización y formación académica.

Abreviaciones

A	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNr	Ácido Ribonucleico ribosomal
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> : material biológico de referencia certificada
C	Citosina
cm	Centímetro
DNTP	Di-nucleótido trifosfato (s)
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> : Ensayo inmuno enzimático
F	<i>Forward</i> : iniciador hacia adelante
G	Guanina
°C	Grados centígrados
g	Gravedad específica
h	Hora (s)
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
kb	Kilo base
long	Longitud
ml	Mililitro
NK	Células <i>Natural Killer</i> : asesina natural
ng	Nanogramo
pb	Pares de bases
PBS	Solución buffer fosfatos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PGF _{2α}	Prostaglandina F _{2α}
pH	potencial de Hidrógeno
PMC	Pubmed Central: librería de revistas científicas
R	<i>Reverse</i> : Iniciador reverso
<i>rpoB</i>	Gen que codifica la subunidad beta de la ARN polimerasa para resistencia a la rifampicina
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación
spp	Especie
T	Timina
Taq	<i>Termus aquaticus</i>
Tm	Temperatura de <i>melting</i> : temperatura de fusión
UI	Unidades internacionales
V	Voltios
X	Objetivo de distancia focal variable
µm	Micrómetro
µg	Microgramo (s)
µl	Microlitro (s)

(-) Negativo
(+) Positivo
° Grados

Contenido

Dedicatorias	I
Agradecimientos	II
Abreviaciones	IV
Contenido	VI
Lista de figuras	X
Lista de cuadros	XI
Resumen	XII
Abstract	XIV
1 Introducción	1
1.1 Causas de problemas reproductivos en equinos	2
1.1.1 No infecciosos	2
1.1.2 Infecciosos	3
1.2 <i>Mycoplasma</i>	4
1.2.1 Diagnóstico	5
1.2.2 Aislamiento e identificación <i>in vitro</i>	5
1.2.3 Identificación molecular	5
1.3 <i>Mycoplasma equigenitalium</i> y <i>Mycoplasma subdolum</i>	6
1.3.1 Mecanismos de patogenicidad	7
1.3.2 Transmisión	9
1.3.3 Mecanismos de defensa uterinos	9
1.3.4 Tratamiento	10
1.4 Bacterias asociadas a problemas reproductivos en equinos	11
1.4.1 Bacterias aerobias	11
1.4.2 <i>Brucella abortus</i>	12
1.4.3 <i>Leptospira interrogans</i>	13
1.5 Métodos de diagnóstico en problemas reproductivos en equinos	14
1.5.1 Hembras	14
1.5.2 Machos	15

2	Hipótesis	16
3	Objetivos	16
3.1	General	16
3.2	Específicos	16
4	Material y métodos	17
4.1	Zona de estudio	17
4.2	Determinación de número de muestra	17
4.3	Grupos de estudio	18
4.4	Colección de muestras	19
4.4.1	Toma de muestra de vagina (hisopado)	19
4.4.2	Toma de muestra de mucosa uterina (hisopado)	19
4.4.3	Toma de muestra para citología	20
4.4.4	Toma de muestra de semen	20
4.4.5	Toma de muestra de sangre para obtención de suero	20
4.5	Cepas de referencia	21
4.6	Aislamiento de <i>Mycoplasma</i>	21
4.6.1	Medio de cultivo	21
4.6.2	Procesamiento de las muestras	21
4.6.3	Identificación de género	22
4.7	Cultivo a escala de las cepas de referencia y aislamientos	23
4.8	Extracción de ADN genómico de <i>Mycoplasma</i> por el método de tiocianato de guanidina	25
4.9	Cuantificación de ADN	25
4.10	Diseño de iniciadores para <i>Mycoplasma equigenitalium</i> y <i>Mycoplasma subdolum</i>	26
4.11	Reacción en cadena de la polimerasa	29
4.12	Aislamiento de bacterias aerobias del aparato reproductor de los equinos	30
4.12.1	Medios de cultivo	30
4.12.2	Procesamiento de las muestras	31

4.13	Pruebas serológicas para el diagnóstico de <i>Brucella abortus</i> y <i>Leptospira interrogans</i>	31
4.13.1	Prueba de tarjeta para <i>Brucella abortus</i>	31
4.13.2	Prueba de Micro aglutinación Microscópica para <i>Leptospira interrogans</i>	31
4.14	Análisis estadístico	32
5	Resultados	33
5.1	Aislamiento de <i>Mycoplasma</i> spp.	33
5.2	Iniciadores dirigidos al gen <i>rpoB</i> para <i>Mycoplasma equigenitalium</i> y <i>Mycoplasma subdolum</i>	33
5.3	Extracción de ADN	33
5.4	Identificación molecular con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa PCR	33
5.5	Aislamiento de bacterias aerobias del aparato reproductor en los equinos	35
5.6	Prueba serológica para la detección de anticuerpos contra <i>Brucella abortus</i>	36
5.7	Prueba serológica para la detección de anticuerpos contra <i>Leptospira interrogans</i>	37
5.8	Determinación de leucocitos polimorfonucleares	39
5.9	Análisis del coeficiente de correlación de Spearman (Rho)	39
5.9.1	Análisis de correlación entre la presencia de micoplasmas y otros géneros bacterianos aerobios	39
5.9.2	Análisis de correlación entre la presencia de micoplasmas y seropositividad a <i>Brucella abortus</i>	40
5.9.3	Análisis de correlación entre la presencia de micoplasmas y títulos de anticuerpos contra <i>Leptospira interrogans</i>	41
5.9.4	Análisis de correlación entre la presencia de micoplasmas y la edad de los animales en estudio	43
6	Discusión	44
6.1	Aislamiento de <i>Mycoplasma</i> spp.	44
6.2	Identificación molecular de <i>Mycoplasma</i>	46

6.3	Aislamiento de bacterias aerobias	47
6.4	Prueba serológica para la detección de anticuerpos contra <i>Brucella</i> en equinos	49
6.5	Prueba serológica para la detección de anticuerpos contra <i>Leptospira interrogans</i>	50
6.6	Leucocitos polimorfonucleares	52
6.7	Análisis del coeficiente de correlación de Spearman	54
6.7.1	Correlación del aislamiento de <i>Mycoplasma</i> y las bacterias aerobias aisladas	54
6.7.2	Correlación del aislamiento de <i>Mycoplasma</i> y la prueba serológica para <i>Brucella</i>	55
6.7.3	Correlación del aislamiento de <i>Mycoplasma</i> y la prueba de Microaglutinación de <i>Leptospira interrogans</i>	55
6.7.4	Correlación del aislamiento de <i>Mycoplasma</i> y la edad de los animales	55
7	Literatura citada	57

Lista de figuras

Figura 1. Metodología para cultivo a escala de <i>Mycoplasma</i>	24
Figura 2. Metodología de la extracción de ADN de las cepas de referencia y los aislados	25
Figura 3. Secuencia del gen <i>rpoB</i> de <i>Mycoplasma equigenitalium</i> y la ubicación de los iniciadores diseñados	27
Figura 4. Secuencia del gen <i>rpoB</i> de <i>Mycoplasma subdolum</i> y la ubicación de los iniciadores diseñados	28
Figura 5. Condiciones de la PCR punto final para <i>Mycoplasma equigenitalium</i>	30
Figura 6. Condiciones de la PCR punto final para <i>Mycoplasma subdolum</i>	30
Figura 7. Productos de la PCR para <i>Mycoplasma equigenitalium</i>	34
Figura 8. Productos de la PCR para <i>Mycoplasma subdolum</i>	34
Figura 9. Distribución de los títulos obtenidos en las muestras de <i>Leptospira interrogans</i>	38
Figura 10 y figura 11. Identificación de células endometriales	39

Lista de cuadros

Cuadro 1. Antecedentes del aislamiento y tipificación de <i>Mycoplasma</i> en muestras de equinos	6
Cuadro 2. Número de animales por sexo	18
Cuadro 3. Edad promedio y desviación estándar de los animales	18
Cuadro 4. Iniciadores diseñados para <i>Mycoplasma equigenitalium</i>	26
Cuadro 5. Iniciadores diseñados para <i>Mycoplasma subdolum</i>	26
Cuadro 6. Reactivos utilizados para la reacción en cadena de la polimerasa de <i>Mycoplasma equigenitalium</i> y <i>Mycoplasma subdolum</i>	29
Cuadro 7. Resultado de la PCR para los aislados de <i>Mycoplasma spp.</i>	35
Cuadro 8. Frecuencia de bacterias aerobias aisladas de equinos	36
Cuadro 9. Frecuencia de seropositividad a serovariedades de <i>Leptospira interrogans</i> en equinos	38
Cuadro 10. Análisis de correlación entre la presencia de micoplasmas y bacterias aerobias en el aparato reproductivo de equinos	40
Cuadro 11. Análisis de correlación entre la presencia de micoplasmas y seropositividad a <i>Brucella abortus</i>	40
Cuadro 12 Análisis de correlación entre la presencia de micoplasmas y seropositividad a <i>Leptospira interrogans</i> serovariedad Pomona	41
Cuadro 13 Análisis de correlación entre la presencia de micoplasmas y seropositividad a <i>Leptospira interrogans</i> serovariedad Bratislava	41
Cuadro 14. Análisis de correlación entre la presencia de micoplasmas y seropositividad a <i>Leptospira interrogans</i> serovariedad Autumnalis	42
Cuadro 15 Análisis de correlación entre la presencia de micoplasmas y seropositividad a <i>Leptospira interrogans</i> serovariedad Grippotyphosa	42
Cuadro 16. Análisis de correlación entre la presencia de micoplasmas y seropositividad a <i>Leptospira interrogans</i> serovariedad Pyrogenes	42
Cuadro 17. Análisis de correlación entre la presencia de micoplasmas y edad de los animales	43

Resumen

“Frecuencia de Micoplasmas en el aparato reproductor de equinos”

M.V.Z. Juárez Cortés Martha Trinidad

Tutor: Dr. Francisco Trigo Tavera

Comité tutor: Dra. Rosa Elena Miranda Morales

M. en C. Laura Jaramillo Meza

El objetivo de este estudio fue determinar las principales especies de *Mycoplasma* y bacterias aerobias presentes en el aparato reproductor de hembras y machos equinos. Para lo cual se procesaron hisopados uterinos, hisopados vaginales y semen, en total se colectaron 146 muestras, 130 fueron de hembras y 16 de machos. Con iniciadores diseñados hacia el gen *rpoB* de *Mycoplasma equigenitalium* y *Mycoplasma subdolum* se estandarizó la técnica de PCR. Además se realizó la tinción de Papanicolaou a citologías endometriales. Para detectar la presencia de anticuerpos contra *Brucella abortus* y *Leptospira interrogans*, se tomaron muestras de suero sanguíneo. El análisis estadístico se realizó con la prueba de coeficiente de correlación de Spearman para evidenciar la relación entre el aislamiento de *Mycoplasma*, bacterias aerobias, presencia de anticuerpos contra *Brucella abortus* y *Leptospira interrogans*, así como, con la evaluación de citologías. Se obtuvieron 7 aislamientos que fueron tipificados como *Mycoplasma* spp.: 3 de útero, 3 de vagina y 1 de semen. Se obtuvo una frecuencia de *Mycoplasma* spp. en el 4.79 % de las muestras. Molecularmente se identificó a *Mycoplasma equigenitalium* en un 2.73 % y *Mycoplasma subdolum* con un 4.10 %. Dentro de las serologías se obtuvo un 4.79% de muestras positivas a *Brucella abortus*; de *Leptospira interrogans* la serovariedad Pomona tuvo títulos >1:100 en 28 animales (19.17%) mientras que en las serovariedades Autumnalis, Bratislava, Grippytyphosa y Pyrogenes se observaron títulos hasta 1:3200. Se concluye que no se observó relación entre el aislamiento de *Mycoplasma*; bacterias aerobias

patógenas; *Brucella abortus*, *Leptospira interrogans* serovariedad Pomona y la presencia de leucocitos polimorfonucleares.

Palabras clave: *Mycoplasma*, bacterias aerobias, *Brucella abortus*, *Leptospira interrogans*, leucocitos polimorfonucleares, PCR.

Abstract

"Frequency of mycoplasmas in equine reproductive tract".

M.V.Z. Juárez Cortés Martha Trinidad

Tutor: Dr. Francisco Trigo Tavera

Tutor Committee: Dr. Rosa Elena Miranda Morales

MSc Laura Jaramillo Meza

The aim of this study was to determine the main species of *Mycoplasma* and aerobic bacteria present in the reproductive system of equine males and females. Uterine swabs, vaginal swabs and semen samples were processed, total of 146 samples were collected, 130 from females and 16 were males. PCR technique was standardized with primers designed to the *rpoB* gene of *Mycoplasma equigenitalium* and *Mycoplasma subdolum*. Besides, Papanicolau staining was performed on endometrial smears. Samples of blood serum were collected to detect the presence of antibodies against *Brucella abortus* and *Leptospira interrogans*. Statistical analysis was performed with the Spearman's rank correlation coefficient to demonstrate the relationship between isolation of *Mycoplasma*, aerobic bacteria, antibodies against *Brucella abortus* and *Leptospira interrogans*, as well as the cytologic evaluation. Seven isolates were obtained and were classified as *Mycoplasma spp.*: 3 of uterus, 3 of vagina and 1 of semen. We obtained a frequency of *Mycoplasma spp.* of 4.79 % in samples. Molecularly, *Mycoplasma equigenitalium* was identified in 2.73% and *Mycoplasma subdolum* in 4.10% of the samples. Serologically, it was obtained a 4.79% of positive samples for *Brucella abortus*; *Leptospira interrogans* serovar Pomona had titers >1:100 in 28 animals (19.17%), while in the serovars Autumnalis, Bratislava, Grippotyphosa and Pyrogenes, titles were observed to 1:3200. It is concluded that there was no relationship between the isolation of *Mycoplasma*; pathogenic aerobic bacteria, *Brucella abortus*, *Leptospira interrogans* serovar Pomona and the presence of polymorphonuclear leukocytes.

Keywords: *Mycoplasma*, aerobic bacteria, *Brucella abortus*, *Leptospira interrogans*, polymorphonuclear leukocytes, PCR.

1 Introducción

Actualmente en el país existen alrededor de 10,000 yeguas de registro para la reproducción en equinos con fin zootécnico: deportivo, recreación y carga (SAGARPA, 2012). La tasa reproductiva puede afectarse tanto por factores anatomofisiológicos como de origen infeccioso. Por lo que, el estudio, tratamiento y solución de los problemas reproductivos requiere tanto de identificar las causas que los originan como, de establecer oportunamente las medidas de control a fin de evitar las pérdidas económicas que conllevan.

Los factores anatomofisiológicos más frecuentes son: partos distócicos (anormalidades anatómicas y funcionales del feto o de la madre que conlleva a tener complicaciones en el parto y como resultado en la mayoría de los casos la muerte del potro) y una mala conformación perianal que se observa en animales de edad avanzada. Por otro lado, alojamientos inadecuados y la falta de aseo por parte del médico veterinario del aparato reproductor de la hembra o del macho equino antes de la monta puede favorecer al establecimiento de infecciones en el aparato reproductor.

A la fecha en México, existen pocos trabajos relacionados con el aislamiento e identificación de los principales microorganismos involucrados en los problemas reproductivos de los equinos, más aún, no se ha realizado trabajo alguno que indique la presencia de micoplasmas en el aparato reproductor de los equinos y la relevancia que puedan tener en los problemas de infertilidad y abortos; así como la repercusión económica y sanitaria que puedan representar en las instalaciones equinas y su posible asociación con otras bacterias.

El aislamiento e identificación de las especies de bacterias del género *Mycoplasma* es costoso, laborioso y prolongado; por lo que, la aplicación de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se considera una alternativa viable y práctica para el propósito de identificación, además de facilitar en su momento un diagnóstico oportuno que permita establecer medidas adecuadas de control en los criaderos.

1.1 Causas de problemas reproductivos en equinos

Las causas de los problemas reproductivos en equinos son multivariadas, en la mayoría de los casos se asocian a agentes infecciosos; sin embargo, su origen puede relacionarse con factores nutricionales, fisiológicos, genéticos y de manejo, por lo que un diagnóstico de certeza dependerá de un correcto criterio profesional, en el cual se deberá conjugar un diagnóstico presuntivo clínico, un diagnóstico epidemiológico y un diagnóstico de laboratorio (Baczynska *et al.*, 2007).

1.1.1 No infecciosos

Dentro de esta categoría encontramos: problemas hormonales, nutricionales, mala conformación anatómica del aparato reproductor de la hembra, deficiente higiene en los alojamientos, falta de experiencia del equipo médico en los servicios de asistencia técnica en reproducción, que puede resultar en una manipulación excesiva en la evaluación del ciclo estral de las yeguas y concluir en trastornos genitales e infertilidad (Sparger *et al.*, 2002). Mientras que, en machos los problemas reproductivos no infecciosos se relacionan básicamente con deficiencias en la motilidad y concentración espermática (Samper y Tibary, 2006).

La endometritis inducida por la monta es considerada también un grave problema, dado que origina inflamación, además de que el lumen uterino responde a los mecanismos de inmunidad que se desarrollan por la presencia de células espermáticas y el plasma seminal. Estudios *in vivo* e *in vitro*, demuestran que los espermatozoides activan el complemento favoreciendo el arribo de polimorfonucleares que a su vez estimulan la secreción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ y otros mediadores químicos de la inflamación que inducen daño al tejido (Troedsson 2006).

1.1.2 Infecciosos

Las infecciones uterinas causadas por bacterias pueden representar entre el 25 al 60 % de los problemas reproductivos en las yeguas (LeBlanc y Causey, 2009). De igual modo, se ha identificado diversas situaciones y factores que favorecen su presentación, dentro de los más comunes, se mencionan:

- ↳ Infecciones uterinas por microorganismos oportunistas consecuencia de una mala conformación perianal (Albihn *et al.*, 2003)
- ↳ Endometritis clínica o subclínica (Hemberg *et al.*, 2005) y es considerada la mayor causa de problemas en la reproducción (Troedsson 2006), debido a que pueden desencadenar los siguientes problemas: pérdida embrionaria temprana, abortos, placentitis, potros sépticos al nacimiento (LeBlanc y Causey, 2009)
- ↳ Edad de la yegua
- ↳ Número de partos
- ↳ Transmisión de bacterias por el semental al momento de la monta o por medio del semen en pajillas contaminadas (Corona y Cherchi, 2009).

Los agentes etiológicos involucrados con origen infeccioso en las complicaciones de la reproducción en equinos son:

- ↳ Parásitos (*Trypanosoma equiperdum*¹, *Babesia equi* y *Babesia caballi*)
- ↳ Virus (Herpes Virus Tipo I y III), arteritis viral equina (Lu *et al.*, 2007)
- ↳ Hongos (*Candida albicans* y *Aspergillus* spp)
- ↳ Bacterias (*Taylorella equigenitalium*¹, *Salmonella abortus equi*¹, *Streptococcus zooepidemicus* subsp *zooepidemicus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Leptospira interrogans* serovariedad Pomona, *Brucella abortus* y *Mycoplasma spp* (Hong *et al.*, 1993)).

¹ Microorganismos exóticos y de notificación obligatoria en México, SAGARPA 2007.

Con la información de todos los posibles agentes infecciosos involucrados en patologías del aparato reproductor en los equinos, es necesario conocer las zonas anatómicas adecuadas para la toma de muestra y así aislar a los microorganismos para posteriormente y con una completa historia clínica relacionar su presencia con complicaciones en la obtención de una gestación en los animales; en el caso de las hembras se puede realizar a partir de 3 cm de la comisura de los labios vulvares hacia el cérvix (Mays *et al.*, 2002). En los machos, las muestras que pueden ser consideradas son: semen, hisopado del prepucio, fosa del glande y de la uretra (Tiago *et al.*, 2012).

1.2 *Mycoplasma*

Los primeros aislamientos de *Mycoplasma* en equinos fueron informados por Beller en 1944.

Mycoplasma equigenitalium, *Mycoplasma subdolum*, *Mycoplasma equirhinis* y *Mycoplasma felis* se han aislado a partir de muestras del aparato reproductor en equinos (Torschanoff *et al.*, 2005). Los sitios anatómicos del aparato genital donde se obtuvo desarrollo en las hembras fue: vagina, cuello uterino y útero, y en los machos: prepucio, pene, uretra. También se ha aislado de semen.

Las especies asociadas con problemas de vaginitis, endometritis, placentitis, aborto e infecciones en la uretra y balanopostitis son: *Mycoplasma equigenitalium* y *Mycoplasma subdolum* (Bermudez *et al.*, 1988 y 1992; Kirchoff *et al.*, 1979).

Se ha informado que especies de este género bacteriano originan neumonías, artritis, conjuntivitis, infertilidad, abortos y problemas en el tracto urogenital en humanos y animales (McAuliffe *et al.*, 2005). Sin embargo, se considera flora normal, por lo que, puede aislarse de animales sin problemas reproductivos (Spergers *et al.*, 2002).

1.2.1 Diagnóstico

El diagnóstico de micoplasmosis se realiza con el aislamiento e identificación bioquímica, pruebas serológicas y actualmente técnicas moleculares. Dentro de las pruebas serológicas, se encuentran: inhibición del crecimiento en disco, inmunofluorescencia indirecta, inmunodifusión doble, ELISA (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) y fijación del complemento, siendo costosas y en algunos casos difíciles en cuanto a la producción de los antisueros (Lemcke *et al.*, 1981).

1.2.2 Aislamiento e identificación *in vitro*

El aislamiento y cultivo de los micoplasmas se lleva a cabo en medios enriquecidos como el medio Hayflick modificado (Hayflick y Chanock, 1965), aproximadamente el crecimiento es evidente de 7 hasta 30 días, por la presencia de turbidez y acidificación o alcalinización del medio (Whitford *et al.*, 1994). La identificación de género comprende: observar la morfología de la colonia, que sea filtrable (0.45 μm), que requiera de esteroides y que se compruebe de que no son formas L (Dienes 1953). Entre las pruebas de identificación bioquímica para la especie se encuentran: fermentación de la glucosa y manosa, hidrólisis de la arginina, urea y gelatina, actividad de la fosfatasa, producción de películas y manchas, reducción del tetrazolio en anaerobiosis y aerobiosis, caseína y hemoadsorción, pero estas pruebas son lentas y tienen un costo elevado (Whitford *et al.*, 1994).

1.2.3 Identificación molecular

El proceso de detección de un agente infeccioso por amplificación *in vitro* de secuencias flanqueadas de un gen específico, consiste: en la extracción y purificación de los ácidos nucleicos de la muestra biológica, seguido de la amplificación del segmento seleccionado del genoma del microorganismo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), finalmente se detectan los fragmentos amplificados por electroforesis en gel de agarosa que

se tiñen con bromuro de etidio para ser visualizados con luz ultravioleta (van Kuppeveld *et al.*, 1994, Costa 2004). La secuencia del gen rRNA 16S se utiliza con mucha frecuencia para la identificación de bacterias del género *Mycoplasma* en diversas especies animales (Pettersen *et al.*, 1996; Pettersen *et al.*, 2001; Willi *et al.*, 2006). El diseño de iniciadores apropiados permite la identificación de especies de *Mycoplasma* con resultados rápidos y buena especificidad, aunque su sensibilidad es baja (van Kuppeveld *et al.*, 1992, López *et al.*, 2009).

1.3 *Mycoplasma equigenitalium* y *Mycoplasma subdolum*

Antecedentes del aislamiento y tipificación de *Mycoplasma* en muestras de yeguas y sementales sanos y con problemas reproductivos, desde 1978 al 2007 se enlistan en el Cuadro 1. Los problemas presentados por los animales fueron: vaginitis, endometritis, placentitis, balanopostitis y uretritis.

Cuadro 1. Antecedentes del aislamiento y tipificación de *Mycoplasma* en muestras de equinos

Año	País	Estudio realizado	Referencia
1978	Alemania	Aislamiento de <i>M. equigenitalium</i> en cérvix	Kirchhoff
1979	Yugoslavia	Aislamiento de <i>M. equigenitalium</i> en semen	Kirchhoff <i>et al.</i>
1984	Polonia	Aislamiento de <i>Mycoplasma</i> en semen	Zgórniak <i>et al.</i>
1987	Canadá	Aislamiento de <i>Mycoplasma</i> en aparato reproductor de la yegua durante el estro	Bermudez <i>et al.</i>
1988	Canadá	Aislamiento de <i>Mycoplasma</i> en hisopos de fosa del clítoris	Bermudez <i>et al.</i>
1995	Argentina	Aislamiento de <i>M. equigenitalium</i> en útero	Copes <i>et al.</i>
2007	Dinamarca	Prevalencia de <i>Mycoplasma</i> en semen e hisopo vaginal de equinos Daneses	Baczynska <i>et al.</i>

1.3.1 Mecanismos de patogenicidad

La patogenicidad de *Mycoplasma* en animales puede darse por dos vías: una infección diseminada por la sangre o una infección diseminada por una lesión localizada (Dybvig y Voelker, 1996). La colonización y la infección dependen de la adhesión de las bacterias del género *Mycoplasma* a los tejidos del huésped, de este modo, se adaptan al hábitat y pueden causar enfermedades que generalmente son de curso crónico (Rottem 2003).

Actualmente, existen pocos estudios relacionados con los mecanismos de patogenicidad de *Mycoplasma equigenitalium* y *Mycoplasma subdolum* en infecciones del aparato reproductor en equinos, pero se conoce que las bacterias del género *Mycoplasma* tienen afinidad por las mucosas respiratoria, ocular y genital. En relación a ello, Moorthy y Spradbrow en 1985, infectaron células traqueales de embrión de pollo y observaron un efecto de ciliostasis y desprendimiento de los cilios a los 6 días post infección con *Mycoplasma subdolum*.

En otro estudio realizado con *Mycoplasma equigenitalium in vivo*, se observó una estrecha asociación del microorganismo a la membrana celular del epitelio uterino, con alteraciones en el movimiento de los cilios, lo que puede ocasionar pérdidas tempranas de gestación en la yegua (Bermúdez *et al.*, 1992).

Uno de los mecanismos de patogenicidad identificado hasta ahora es la:

- ✎ **Variabilidad antigénica.** El género *Mycoplasma* muestra una alta frecuencia de variabilidad en sus antígenos de superficie, como se ha observado en las tasas de expresión, tamaño y los cambios en la estructura de sus proteínas de superficie de membrana, lo cual modifica su susceptibilidad al complemento y células fagocíticas, así como, la capacidad de formar biopelículas (Rosengarten y Yogey, 1996).

Torschanoff y col., en 2005, demostraron que la proteína “PET45” de *Mycoplasma equigenitalium* y las proteínas “PST17” y “PST42” de *Mycoplasma subdolum*, exhiben variación en su tamaño molecular y una alta frecuencia en la variación de fase de 10^{-4} a 10^{-2} por célula generada; ellos sugieren, que estos cambios facultan a los micoplasmas a evadir el sistema inmune, además de alterar la función y la adherencia a células epiteliales.

Otros mecanismos de patogenicidad que se mencionan del género son:

- ∞ **Adhesinas.** Son proteínas que participan en la adhesión de la célula bacteriana a las células epiteliales del hospedero. Algunas especies de *Mycoplasma* las presentan, por ejemplo, se conoce la adhesina P1 de *Mycoplasma pneumoniae* que promueve la motilidad y la variación antigénica (Nakane *et al.*, 2011). Otra adhesina es la MgPa de *Mycoplasma genitalium* (Svenstrup *et al.*, 2006). En Salud Animal la adhesina P40 de *Mycoplasma agalactiae* es una de las más estudiadas (Fleury *et al.*, 2002).
- ∞ **Lipoproteínas.** Participan en la infección del hospedero y una de sus funciones es la activación de receptores tipo Toll con la consecuente liberación de citocinas proinflamatorias, además de favorecer su adhesión a la célula. Por su tamaño pueden tener variación de fase y promueven la respuesta inmune (Chambaud *et al.*, 1999, Whithear y Browning, 2008).
- ∞ **Producción de H₂O₂.** Es producto de su metabolismo de la oxidación del glicerol, origina lisis en los eritrocitos y en estudios experimentales han observado inhibición de movimientos ciliares en tráquea y peroxidación de los lípidos infectados en fibroblastos de bovinos (Pilo *et al.*, 2005; Bischof *et al.*, 2008)

- **Cápsula.** Compuesta por polisacáridos; el más estudiado es el galactano que causa un efecto tóxico en las células y contracción de los vasos sanguíneos lo que provoca una trombosis (Pilo *et al.*, 2007).

A la fecha aún no se cuenta con estudios que describan e identifiquen la participación de mecanismos de patogenicidad, como las adhesinas, lipoproteínas, producción de H₂O₂ y la presencia de compuestos capsulares en la patogenia de las infecciones por *Mycoplasma equigenitalium* y *Mycoplasma subdolum*.

1.3.2 Transmisión

La transmisión de infecciones por micoplasmas en los equinos dedicados a la cría y reproducción, puede darse al momento de la monta o por el uso de semen contaminado y durante el parto (Samper y Tibary, 2006; Lu *et al.* 2007).

1.3.3 Mecanismos de defensa uterinos

Los micoplasmas poseen estructuras con propiedades inmunomoduladoras, como el lipopéptido activador de macrófagos, que tiene la capacidad de activar monocitos, macrófagos, linfocitos T y B, lo que induce la liberación de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral α (TNF α), interleucina (IL)-1, IL-6, IL-8, IL-10 y IL-13. Además de favorecer la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I y II (Rottem 2003). De igual modo, incrementa la citotoxicidad de macrófagos, células NK, linfocitos T y activa la cascada del complemento por la vía clásica y la vía alterna, durante la interacción de los micoplasmas con las células del sistema inmune.

Se ha observado que al inducir la producción de IL-10 e IL-13, éstas estimulan la producción de IgG₁ e IgE por parte de los linfocitos B e inhiben tanto las funciones de los

macrófagos en la producción de citocinas proinflamatorias como la proliferación de células T y producen un desbalance entre los linfocitos Th1 y Th2 (Razin *et al.*, 1998).

Los micoplasmas tienen la habilidad para presentar cambios en su fenotipo lo que resulta en variaciones antigénicas de algunos componentes de la membrana, muchos de los cuales comparten epítomos con las células eucariotas del huésped, dando como resultado la evasión de la respuesta inmune e inducción de la producción de anticuerpos por la activación de linfocitos T y B autoreactivos (Dybvig y Voelker, 1996).

1.3.4 Tratamiento

Los micoplasmas carecen de pared celular, por lo que, los antibióticos de elección para los tratamientos son: enrofloxacina, ciprofloxacina, clindamicina, oxitetraciclina, tilosina, estreptomycinina y lincomicina.

En equinos no existen informes del uso de antibióticos para infecciones ocasionadas por micoplasmas, pero en perros infectados con *Mycoplasma* se recomienda el uso de dociciclina o tetraciclina (Chalker 2005).

Se necesitan estudios de sensibilidad a quimioterapéuticos para identificar el antibiótico adecuado en equinos, como se efectuó en humanos con problemas de infertilidad e infecciones de *Mycoplasma genitalium*, se determinó que la azitromicina y la josamicina con buenos resultados (Figueroa *et al.*, 2009; Butt *et al.*, 2012).

1.4 Bacterias asociadas a problemas reproductivos en equinos

1.4.1 Bacterias aerobias

En el aparato reproductor pueden estar presentes bacterias que se consideran microbiota normal, la cual bajo circunstancias fisiológicas asociadas a la edad, estrés e higiene deficiente pueden causar enfermedad en el hospedero (Eisenstein y Schaechter, 1994).

Diversos géneros bacterianos están involucrados en afecciones del aparato reproductor de la hembra, dentro de ellos se han identificado a: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium* spp., *Corynebacterium haemolyticum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus* spp., *Micrococcus* spp., *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus equi* subsp *zooepidemicus*, *Klebsiella pneumoniae* (Samper y Tibary, 2006).

Un cultivo bacteriano ayuda a elegir el tratamiento adecuado para mejorar la eficiencia en las yeguas con infecciones en el útero, sin embargo, en la mayoría de los centros de reproducción en México se excluye el diagnóstico microbiológico (Albihn *et al.*, en 2003).

En un estudio realizado en Florida durante el periodo de 1999 a 2001, se identificó a *Streptococcus equi* subsp *zooepidemicus* como la bacteria más aislada en problemas de placentitis en las yeguas (Morris *et al.*, 2007). Por otro lado, *Pseudomonas aeruginosa* es un agente asociado con diferentes patologías en los equinos, tales como: abscesos, neumonía, otitis, conjuntivitis, heridas e infecciones genitourinarias (Tazumi *et al.*, 2009).

En machos, se ha aislado a *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus zooepidemicus* subsp *zooepidemicus*, *Acinetobacter calcoaceticus* y *Proteus vulgaris*, en infecciones de vesículas seminales; de igual modo se ha determinado ser causantes de infertilidad por la colonización (Samper y Tibary, 2006).

Es relevante mencionar que *Taylorella equigenitalis*, es una bacteria altamente transmisible que origina la Metritis Contagiosa Equina, problema que se caracteriza por descargas mucopurulentas y vaginitis que finalmente resultaran en infertilidad; en los machos no se observan signos clínicos por lo que es vital su diagnóstico para evitar las infecciones a las yeguas por monta natural o inseminación artificial con semen contaminado (Lu *et al.*, 2007).

1.4.2 *Brucella abortus*

Las especies de *Brucella* que se pueden aislar en los equinos son: *abortus*, *suis* y *melitensis*, sin ser específicas de este hospedador. La manifestación clínica más común es una fistula en la zona lumbar alta llamada “Mal de la Cruz” y en menor frecuencia ocasiona artritis y tendinitis (Megid *et al.*, 2010).

La información sobre los índices de incidencia y prevalencia de brucelosis en equinos en nuestro país es escasa, al igual que el impacto que puede tener en la producción y crianza equina; al respecto, Acosta-González *et al.*, en un estudio realizado durante el 2006, de una población de equinos del norte de México no encontraron evidencia de este microorganismo con pruebas serológicas (prueba de tarjeta al 3 y 8 % y prueba de Rivanol). Otro estudio realizado en Caldas, Colombia señaló una baja prevalencia de brucelosis en los equinos sin problemas en la reproducción (Aricapa *et al.*, 2008).

Una infección en equinos con *Brucella abortus* puede causar aborto a mitad de la gestación e infertilidad, esto se comprobó al aislar a la bacteria de fetos y membranas fetales de las yeguas que presentaron un resultado positivo a las pruebas serológicas (Mair y Divers, 2009).

La infección frecuentemente ocurre por ingestión de alimento o agua contaminada, o por contacto directo con otras especies de animales infectados, como cerdos o bovinos (Megid *et al.*, 2010).

En un estudio realizado en Argentina de 1968 a 1991, en muestras de equinos provenientes de los países: Argentina, Brasil y Cuba se aisló *Brucella abortus* y *Brucella suis*. Los autores hacen énfasis en determinar si la transmisión a humanos es por el contacto con animales infectados, pues en salud pública es difícil diagnosticar la presencia de esta bacteria, por la dificultad de su aislamiento, tiempo prolongado para su cultivo y el requerimiento de laboratorios de bioseguridad autorizados; por lo que, concluyen que las muestras sanguíneas son una excelente opción para el diagnóstico (Lucero *et al.*, 2008).

En otro estudio realizado en Asmara, capital de Eritrea a los equinos que eran utilizados para recolectar la leche y llevar el alimento a las granjas, se les tomó muestra de sangre para realizar las pruebas de Tarjeta y Fijación del Complemento, en ambas no encontraron títulos de anticuerpos contra *Brucella abortus*, los autores indican que al confrontar las técnicas y encontrar los mismos resultados, puede utilizarse la primera o segunda con seguridad de identificar a los animales positivos (Omer *et al.*, 2000).

En países del Oriente se ha observado una incidencia de un 20.61%, 5.88 y 71.42 % de brucelosis en burros, caballos y mulas, respectivamente (Refai, 2002). El autor menciona la relevancia de mantener a los animales en confinamiento y detener su movilización hasta saber que no presenta la enfermedad verificando su nivel de anticuerpos.

1.4.3 *Leptospira interrogans*

La leptospirosis en equinos se presenta de forma subclínica o asintomática, como lo indican diversos autores al informar títulos de anticuerpos elevados de diferentes serovariedades en equinos aparentemente sanos (Donahue *et al.*, 2000). La fuente de infección por lo regular es de animal a animal, se dispersa el agente etiológico en el ambiente principalmente por la orina y es destacado mencionar que no se lleva a cabo en México la práctica de vacunación en los equinos (Caro y Gutiérrez, 1999).

En un estudio realizado en placentas de fetos abortados de criaderos en Kentucky se aisló a *Leptospira interrogans* serovariedades Bratislava y Pomona en un 15.67 %, señalando la participación de esta bacteria en problemas reproductivos; también se menciona que ésta fue localizada en la estrella cervical lo que orienta a encontrar a esta bacteria en el cérvix (Hong *et al.*, 1993).

1.5 Métodos de diagnóstico en problemas reproductivos en equinos

1.5.1 Hembras

Los métodos convencionales para identificar el origen del problema incluyen: edad, historia reproductiva, identificación de anomalías en el aparato reproductor por palpación rectal, vaginoscopia, cultivos bacterianos, biopsias y citologías endometriales (Doig *et al.*, 1981; LeBlanc y Causey, 2009).

El ultrasonido en diferentes etapas del ciclo estral nos puede arrojar información que oriente al diagnóstico del problema, los más comunes son: acumulación de líquido en el útero (puede ser ocasionado por la presencia de bacterias), quistes ováricos o quistes endometriales (Morris *et al.*, 2007).

Dentro de los factores no infecciosos en el aparato reproductor se conocen: fibrosis, adherencias epiteliales, dificultad de la eliminación del líquido seminal y diluentes de semen congelado por el proceso de fagocitosis; una consistencia altamente viscosa de secreciones propias del útero, las cuales dificultan la implantación y por ende la pérdida embrionaria temprana (Doig *et al.*, 1981). La edad en las yeguas tiene una gran correlación con estas manifestaciones y pueden ser corroborados con citologías o biopsias endometriales (Davies Morel *et al.*, 2009). Overbeck *et al.*, 2011, mencionan que un recuento mayor al 2 % de leucocitos polimorfonucleares en citologías endometriales puede ser utilizado como un indicador de inflamación, aunque en la literatura se manejan diferentes parámetros (Le Blanc y Causey, 2009).

1.5.2 Machos

Las pruebas diagnósticas de infertilidad o subfertilidad en los sementales se lleva a cabo con la evaluación de su historia reproductiva y del eyaculado, en este último se considera la presencia excesiva de neutrófilos, eritrocitos o ambos (Sieme *et al.*, 2004).

Para comprobar la posible presencia de bacterias en el aparato reproductor del macho, se puede tomar muestra con hisopo del área lesionada o semen y enviarlas al laboratorio para el aislamiento del agente (Samper y Tibary, 2006).

Cuando se sospecha de problemas en las vesículas seminales una evaluación con ultrasonido o un examen endoscópico puede confirmar una infección (Pozor 2005).

2 Hipótesis

Especies del género *Mycoplasma* pueden estar presentes en diferentes sitios anatómicos del aparato reproductor de los equinos.

3 Objetivos

3.1 General

U Determinar las especies más frecuentes de *Mycoplasma* y bacterias aerobias presentes en el aparato reproductor de hembras y machos.

3.2 Específicos

👉 Aislar y tipificar bioquímicamente bacterias del género *Mycoplasma*, así como, bacterias aerobias del aparato reproductor de hembras y machos.

👉 Realizar la identificación de las especies: *Mycoplasma equigenitalium* y *Mycoplasma subdolum* mediante la PCR.

👉 Determinar la seroreactividad de los equinos de estudio hacia *Brucella* y a doce serovariedades de *Leptospira interrogans*.

👉 Realizar citologías endometriales con tinción de Papanicolaou.

4 Material y métodos

De animales de recría sanos se tomaron muestras de útero, vagina y semen con el fin de determinar el o los agentes etiológicos presentes. El periodo de muestreo abarcó de Enero de 2010 a Marzo de 2011.

4.1 Zona de estudio

El estudio se realizó en criaderos dedicados a la cría y reproducción de equinos ubicados en diferentes estados de la república: Chihuahua, Distrito Federal, Estado de México, Hidalgo, Morelos, Puebla y Veracruz.

4.2 Determinación de número de muestra

El número mínimo de muestras se estableció con la fórmula de población finita descrita por Daniel 2004:

$$n = \frac{N * Z^2_{\alpha} p * q}{d^2 * (N - 1) + Z^2_{\alpha} * p * q}$$

Dónde:

n = Número mínimo de muestras

N = Total de la población

$Z^2_{\alpha} = 1.96^2$ (confianza del 95%)

p = probabilidad esperada (en este caso 5% = 0.05)

q = 1 – p (en este caso 1-0.05 = 0.95)

d = precisión

El número total de animales de la población analizada en estudio fue de 520 (hembras y machos) y se determinó un resultado de 146 muestras.

$$n = \frac{520(1.96^2)(0.05)(0.95)}{\quad} = \underline{94.8875} = 146.09 = 146$$

$$0.03^2(520-1)+1.96^2(0.05)(0.95) = 0.6495$$

Aleatoriamente se tomaron un total de 146 muestras en los diferentes criaderos.

4.3 Grupos de estudio

De 7 centros de reproducción de diferentes estados en México, aleatoriamente se eligió a 146 animales los cuales se describen en el Cuadro 2. El rango de edad en los animales fue de 4 a 25 años, su promedio y desviación estándar se describen en el Cuadro 3.

Cuadro 2. Número de animales por sexo

	Hembras	Machos
Chihuahua	31	6
Distrito Federal	11	-
Estado de México	48	8
Hidalgo	5	-
Morelos	11	1
Puebla	11	1
Veracruz	13	-
Total	130	16

Cuadro 3. Edad promedio y desviación estándar de los animales

Grupo	Sexo	Número	Promedio ± desviación estándar
1	Hembra	130	9 ± 4
2	Macho	16	9 ± 3.3

4.4 Colección de muestras

Los medios de transporte utilizados fueron, para *Mycoplasma* el medio Hayflick modificado y para el aislamiento de bacterias aerobias el medio Stuart. Los medios de transporte fueron refrigerados hasta llegar al laboratorio.

4.4.1 Toma de muestra de vagina (hisopado)

Cada muestra se colectó con la yegua en pie y con el uso de 2 hisopos estériles de 20 cm de largo. El procedimiento consistió en abrir los labios vulvares e introducir cada hisopo en dirección del techo de la vagina acompañado de movimientos circulares en una sola dirección y de arrastre. Una vez realizado, se depositaron en los medios de transporte.

4.4.2 Toma de muestra de mucosa uterina (hisopado)

Se usaron hisopos tipo McCullough, para la toma de muestra de mucosa uterina como lo describe Dascanio *et al.*, en 1997.

El procedimiento se realizó con las yeguas de pie. Las colas se vendaron y posteriormente se lavó la zona perianal con jabón neutro (tres veces) y se secó con toallas absorbentes.

Se utilizó guante de palpación largo seguido de un guante estéril y en el dorso de la mano se colocó gel lubricante estéril, después se introdujo vía vaginal. Consecutivamente, se siguió el techo de la vagina hasta localizar el cérvix y se deslizó el hisopo aproximadamente 20 cm. Una vez dentro del útero se quitó el seguro del hisopo y se empujó la primera protección, a continuación se introdujo el hisopo y se colocó en la superficie del útero y con movimientos circulares, se tomó la muestra. Para retirar, se retrajo el hisopo dentro de las protecciones y se cubrió con el dorso de la mano al alcanzar el cérvix para evitar lesionar la vagina. Una vez fuera del aparato reproductor, se depositaron en los medios de transporte.

4.4.3 Toma de muestra para citología

Se tomó la muestra como lo describe Dascanio *et al.*, en 1997, con hisopo de doble protección y asepsia, con movimiento circulares y de arrastre en la superficie de la mucosa uterina y las células recogidas en el hisopo se transfirieron por impronta a 2 portaobjetos de cristal; se fijaron en alcohol etílico al 90 % durante 10 minutos para ser teñidos posteriormente con el método Papanicolau

Las laminillas se observaron al microscopio óptico² con objetivo de 40 X, para la evaluación se observó un total de 10 campos elegidos aleatoriamente en la laminilla y los resultados se anotaron y se expresaron en término de número de polimorfonucleares en 10 campos 40 X (Martínez Sosa, 2011).

4.4.4 Toma de muestra de semen

Se utilizó una vagina artificial tipo Missouri o Colorado y del eyaculado se tomó una muestra de 5 ml. Se conservaron las muestras en refrigeración hasta llegar al laboratorio.

4.4.5 Toma de muestra de sangre para obtención de suero

De los animales se obtuvo muestra de sangre de la vena yugular con tubo vacutainer sin anticoagulante. Se realizó la asepsia con torundas de alcohol al 70 % y los tubos se dejaron reposar para obtener el suero sanguíneo, este se depositó en tubos tipo eppendorf de 1.5 ml los cuales se conservaron en refrigeración hasta el laboratorio, después se congelaron a – 20 ° C hasta su uso.

² Microscopio Óptico Leica CME

4.5 Cepas de referencia

Las cepas utilizadas como testigos positivos fueron:

● *Mycoplasma equigenitalium* ATCC 29869

● *Mycoplasma subdolum* ATCC 29870

Además, se utilizaron como testigos negativos:

● *Mycoplasma bovis* (cepa Donneta PG45)

● *Mycoplasma dispar* (462/2)

Cada una de ellas fue cultivada en el medio Hayflick modificado para verificar su viabilidad.

4.6 Aislamiento de *Mycoplasma*

4.6.1 Medio de cultivo

Se utilizó el medio de Hayflick líquido y semisólido, al cual se le adicionó 20 % de suero de equino, extracto de levadura fresca al 10 %, glucosa al 1 %, penicilina 100 000 UI/ml y como indicador de pH, rojo de fenol al 0.5 %. Para realizar el medio semisólido se utilizó agar noble³ con una concentración del 0.8%.

4.6.2 Procesamiento de las muestras

Se siguió la metodología establecida por Tully *et al.*, de 1983. Se tomaron 30 µl de la muestra de hisopado contenida en el medio de transporte los cuales se colocaron en una placa de agar semisólido de medio Hayflick, e incubaron⁴ a 37° C en una atmósfera de microaerobiosis con humedad del 80 al 85 %, por 24 a 48 horas. Al mismo tiempo, se

³ Laboratorio Difco

⁴ Incubadora Fisher Scientific Isotem Thermo

tomaron 200 μ l y se depositaron en 1.8 ml de medio Hayflick líquido, para efectuar diluciones decimales desde 10^{-1} hasta 10^{-3} y se incubaron a 37° C en aerobiosis. Los tubos se revisaron diariamente para observar cambio de pH o turbidez, si las diluciones presentaban alguna de las dos reacciones, se procedió a sembrarlos en medio semisólido con las mismas condiciones al primocultivo, este procedimiento se realizó una vez por semana durante un mes para considerar una muestra como negativa (Ruhnke y Rosendal, 1994). Las placas de medio semisólido fueron observadas diariamente durante 7 días con la ayuda de un microscopio estereoscópico⁵ para distinguir colonias con morfología típica de *Mycoplasma*.

Posteriormente se realizó la técnica de clonación triple para obtener un cultivo puro a partir de una colonia de *Mycoplasma* (Whitford *et al.*, 1994).

4.6.3 Identificación de género

A partir de un cultivo líquido de la cepa a examinar con 24 horas de incubación se realizaron las pruebas de identificación para determinar el género bacteriano:

U **Morfología de colonia.** Una colonia típica de *Mycoplasma* se observó como un halo externo y un punto central en el medio de cultivo semisólido de Hayflick (Howard *et al.*, 1994).

U **Filtrabilidad.** Se filtró con una membrana de poro de 0.45 μ m de diámetro en un porta filtros estéril. Después se inoculó en una placa de medio semisólido de Hayflick para comprobar el crecimiento de las bacterias filtrables (Howard *et al.*, 1994).

U **No reversión de formas “L”.** Prueba que confirma la naturaleza de la clase *Mollicutes* y se descarta la presencia de una forma L que por algún inhibidor evita el desarrollo de la pared celular. La prueba se realizó eliminando la penicilina como inhibidor presente

⁵ Microscopio esteresocópico Zeiss Wets Germany

en el medio de cultivo líquido y semisólido, que permitió el desarrollo de las colonias con morfología típica de *Mycoplasma* (Tully *et al.*, 1983).

U Requerimientos de esteroides. Se realizó la prueba de digitonina para demostrar la dependencia de esteroides, prueba que permitió diferenciar a los géneros *Mycoplasma* de *Acholeplasma*. Se utilizó el medio de Hayflick semisólido y discos de papel filtro impregnados con una solución de digitonina al 1.5 % con etanol absoluto. Se realizaron diluciones decimales desde 10^{-1} hasta 10^{-3} . De cada una de ellas se tomaron 30 μ l, la gota se depositó y se deslizó en la superficie del agar, se dejó secar, después se colocó el disco de la digitonina. Las placas se incubaron en condiciones de micro aerobiosis a 37 °C y con 80 - 85 % de humedad. Después de 3 días de incubación, en un resultado positivo se observó un halo de inhibición alrededor del disco. Las bacterias dependientes de esteroides no crecieron cerca del disco, con esto se evidenció la presencia del género *Mycoplasma* y las que crecieron alrededor del disco se identificaron como *Acholeplasma* (Tully *et al.*, 1983, Howard *et al.*, 1994).

4.7 Cultivo a escala de las cepas de referencia y aislamientos

Se siguió la metodología indicada por Tully *et al.*, de 1983 (Figura 1) para obtener 80 ml de las cepas de referencia *M. equigenitalium* ATCC 29869, *M. subdolum* ATCC 29870, *M. bovis* (cepa Donneta PG45), *M. dispar* (462/2) y de los aislados de *Mycoplasma spp.*, obtenidos de las muestras de útero, vagina y semen, los cuales se cultivaron a una escala mayor para la extracción de ADN.

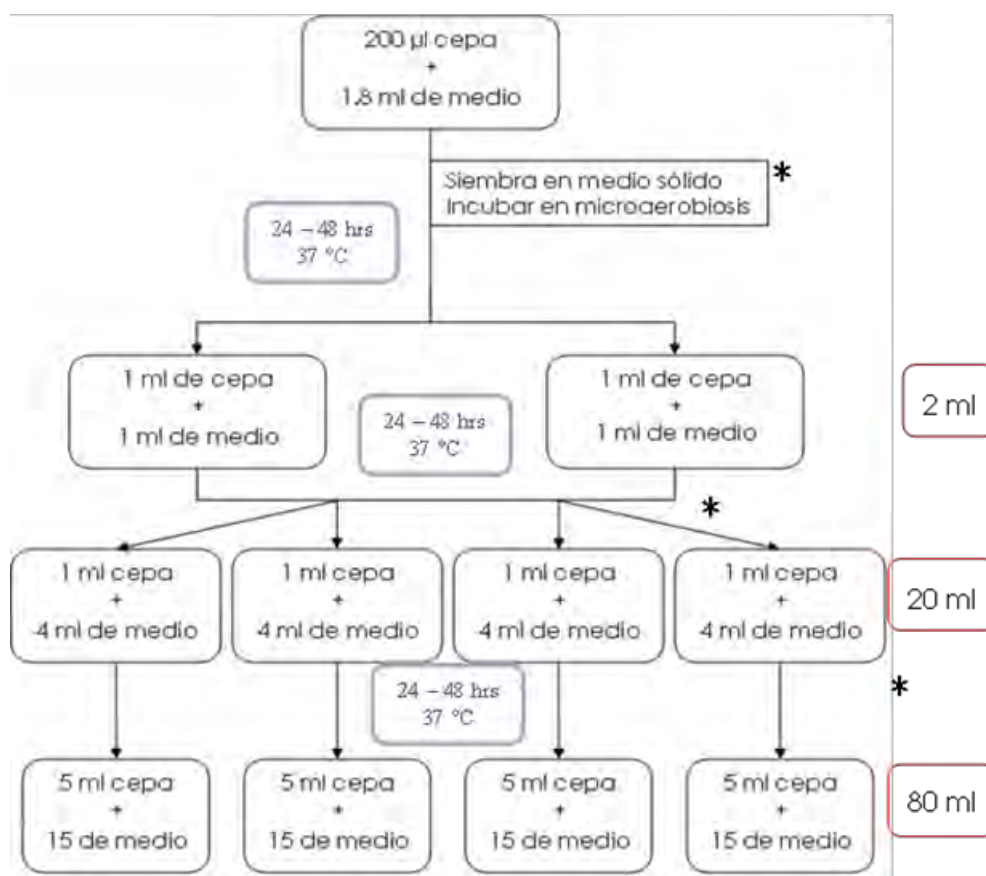


Figura 1. Metodología para cultivo a escala de *Mycoplasma*

El tiempo de incubación se consideró de acuerdo al cambio de pH del medio de cada especie. Las placas se observaron en un microscopio estereoscópico donde se comprobó la viabilidad de las cepas.

Los 80 ml de concentrado se centrifugaron⁶ a 9000 g durante 45 min, a la pastilla se le añadió un amortiguador de fosfatos (PBS) pH 7.2 y se mezcló con un agitador mecánico⁷ para suspender; se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones por tres ocasiones más. Al finalizar, la pastilla se suspendió en 1 ml de PBS para ser almacenada a - 20° hasta su uso.

⁶ Centrifuga Electron Corporation Sorvall Biofuge Thermo Scientific

⁷ Agitador mecánico Vortex Labnet VX 1000

4.8 Extracción de ADN genómico de *Mycoplasma* por el método de tiocianato de guanidina

Se siguió la metodología de tiocianato de guanidina⁸ para la extracción de ADN como lo indican Sambrook y Ruseel en 2001, Figura 2:

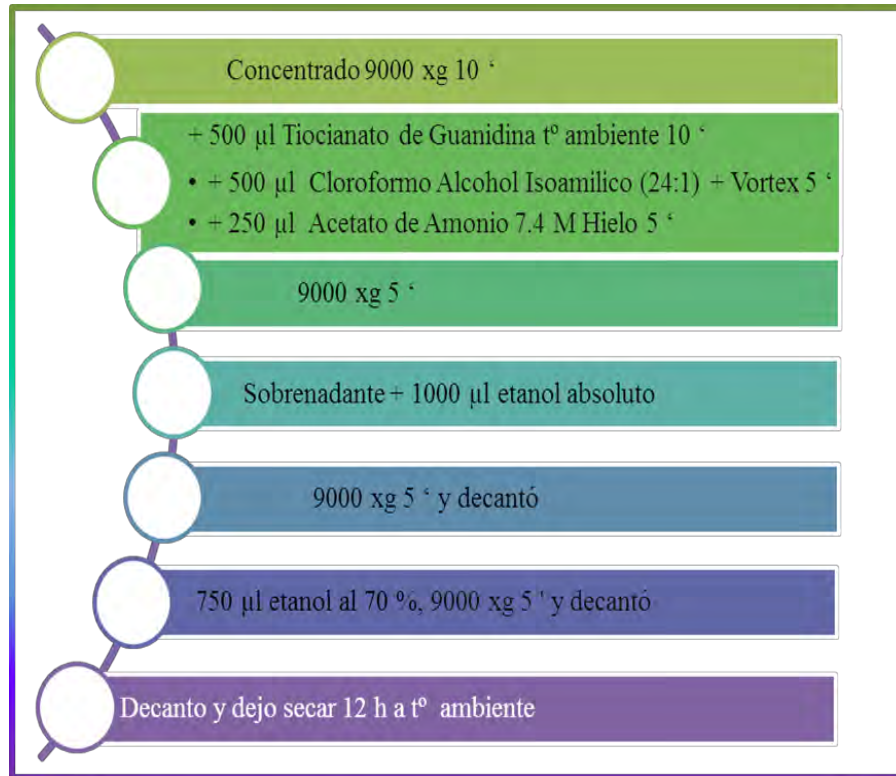


Figura 2. Metodología de la extracción de ADN de las cepas de referencia y los aislados

4.9 Cuantificación de ADN

La pastilla de ADN se mezcló con 50 µl de agua bidestilada estéril y se cuantificó en un espectrofotometro⁹, se toma 1 µl de la suspensión y se coloca en el lector del equipo, posteriormente se observa el resultado obtenido. Se almacenó a 4 °C hasta su uso.

⁸ BioBasic Inc.

⁹ Nanodrop 3300 Thermo Scientific

4.10 Diseño de iniciadores para *Mycoplasma equigenitalium* y *Mycoplasma subdolum*

Se tomó como base la secuencia informada en el GenBank¹⁰ del gen *rpoB* de *M. equigenitalium* (Figura 3) y *M. subdolum* (Figura 4), los iniciadores se diseñaron de forma manual y se evaluaron con el programa Oligo analyzer¹¹ versión 3.1. Además, se valoraron en relación al porcentaje de identidad con otras especies de *Mycoplasma* en el programa Blast¹² de PMC Central. Los iniciadores para cada especie se describen en el cuadro 4 y 5.

Cuadro 4. Iniciadores diseñados para *Mycoplasma equigenitalium*

Forward	CAGAAGCACCCTTGGTTGGAAGT	Tm= 72°C	long 24 pb
Reverse	GCTCACCTCACTACATGAACTAC	Tm= 72°C	long 24 pb
Producto final: 294 bp			

Cuadro 5. Iniciadores diseñados para *Mycoplasma subdolum*

Forward	CTGAAGATGTTGATTATGTTGCTGC	Tm= 70°C	long 25 pb
Reverse	GTAACAATTCCATCATGAAGTGCTC	Tm= 70°C	long 25 pb
Producto final: 235 bp			

¹⁰ National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine USA

¹¹ Integrated DNA Technologies, Inc

¹² National Library of Medicina USA

>gi|80978860|gb|DQ219494.1| *Mycoplasma equigenitalium* strain ATCC 29869 RNA polymerase beta subunit (rpoB) gene, partial cds

```
1 atcaatccac ttgccgaact ttcaagtaaa cgtcgtttaa cttcgcttgg gcctgggtgg  
61 cttaaccgtg atacagcaca attcgaagtt cgggatgttc accctactca ctatggaaga  
121 atttgtccaa ttgaaacacc tgaaggacca aacatcggtc ttattcttaa tttagcatca  
181 catgcgcgtg tgaatgaatt aggattcttg gaaactccat atttcagagt taatgatgg  
241 gttgttgact ataatgatgt ttgttatctt tcagcagctg aagaaacagg tcatatcttt  
301 attcaatctt caactaaagt taacgaaaac aatgaaattg ctgacgattt tgttgtcgct  
361 cgttacaatg gtgattatat tcaagtgcc aaaaacagaag ttgaatttat cgatgtcgac  
421 tcgaagcaaa tgacttcgct tgctgcaagt gcaattcctt tccttgaaaa tgacgatgct  
481 aaccgtgctc ttatgggttc aaacatgcaa cgtcaagcag tgccactttt aatttcagaa  
541 gcaccacttg ttggaactgg aattgaggct gatattgcta aattctcata ctcaaattgt  
601 gtttgtgaac gtgctgggtga agttgtttat gttgatggta atcggattga aattaaacc  
661 gaagaagaca agaaaaaca aaaaggctac gttgacaaat actacttacg ggtatttgaa  
721 cgttcaaacc aagcatcact tattcaccaa aaaccggttg taaaacttgg cgattttgtt  
781 gaagaagggtg aaattattgc cgatggtagt tcatgtagtg agggtgagct ttcgcttgg  
841 aaaaatgtga ttgttgcttt cagtacttta aatggataca actatgaaga tgctgttatt  
901 ttaagtgaaa gacttgtaaa agatgatggt tatacttcga ttcacattga agaacaaca  
961 attcaattta gaaattcaaa agctggaaat gacatttta caaccgatat tccaaataca  
1021 tcaacagcct caaaacgtca cttgatgcc aatggatttg taacaattgg atcgggaagt  
1081 caaccagggtg atatttttagt aggtcgtggt tcaccaaag ctgatgaca cccaactcca  
1141 gaagaaaaat tactttcagc attattcagt aaaaaacaag caaatactcg tgatacatca  
1201 cttaaagtta aaaatgggtca ctcaggaaca attattgata ccgaagttct atcacgtgaa  
1261 aacgggtgatg ttcttgaaga tgggtgttgaa aaaattgtta aggtttgaat cgctcaaaaa  
1321 cggaaaatta aagttgggtga caagatggct ggtcgtcacg gtaacaaagg ggttatttca  
1381 attgttttac cagttgaaga catgccttat atggcagatg gaacaccctg tgatatacgtt  
1441 cttaaccac aaggggtacc ttcacggatg aacatcggac aagttcttga acttcacctt  
1501 ggttttagcag cgaaaaaatt aggcgttaaa tttgcaactc ctgtttttga tggaaattaat  
1561 aaagatcaaa tttttgctgc attaaaagaa gctggcttac ccgaaaatgg taagatgact  
1621 ctttatgatg gggtaactgg tgaaccattt gataaaca aa tttcggttgg aattatgat  
1681 atgcttaaac taagccacat ggttgatgac aagatgcacg cacggagcat tgggccatac  
1741 tcattgatta cacaacaacc acttgggtgg aagtcgcaa acgggtggaca aaga
```

Figura 3. Secuencia del gen *rpoB* de *Mycoplasma equigenitalium* y la ubicación de los iniciadores diseñados para obtener un producto de 294 pb

>gi|98991111|gb|DQ514615.1| *Mycoplasma subdolum* strain ATCC 29870 RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene, partial cds

```
1 tcaatgtaat ccattagctg aaatgtcaaa caaaagaaga atcacttcac ttggaccacg
61 tggctttaat agagacactg ctcaatttga agttcgtgac gttcaccceta ctcactttgg
121 acgtatttgt ccaattgaaa ctccagaagg accaaacatc gggcttatct taaacttagc
181 ttcatttgca aaaattgacc gcttcggatt tttacaaagc ccatacttta gagttaaaaa
241 tcgtcacggt gatttttcag aacctattta tttactgct attgaagaaa ttggttatac
301 ctttactcaa tcaactattc atattgataa aaaaggttat attactgatg actttgttat
361 ggcaagaaaa aataatgaat atatggaagt taaagctgaa gatggtgatt atggtgctgc
421 aagtaacaga caaatgacat caattgctgc ttctgctatc ctttttctag aaaatgacga
481 tgctaaccgt gccctaattg gttcaaacat gcaaagacaa gcagtaccag ttttaagtcc
541 agaagcacca cttgttgcaa ctggagttga agctgatggt gctaaatatt cttcaaccaa
601 cataagagca cttcatgatg gaattgttac ttatattgat tcacaaaaaa ttaaagttca
661 aattagtgga agtagtaaaa ctgaaactta tttcttaaga actttcgaac gttcaaatca
721 aggaacttta attcatcaaa ctccaattgt aaaaattgga caagaaataa aagctggcga
781 tcttttagtt gatggacctt caatgaaaga tggagaaatg gcacttggtta aaaacgtttt
841 agtaggtttt actacttgaa atggttataa ctatgaagat gctgttattc tttcagaaag
901 acttgtaaaa gatgatgttt atacctcaat tcatattgaa gaacaaacaa ttcaatttag
961 acattcaaaa gcaggtgaag attgattaac cgatgatatt ccaaatgcaa gtaactattc
1021 aaaacgtttc ttagatgaaa atggaattgt aagaattgga tcagaagtta gtgcaggaga
1081 tatttttagtt ggaagaacta gtcctaaagg tgaagaaaac ccaactcctg aagaaaaact
1141 aatggcagca attttcggtc aaaaaacttc atcaagaaaa gacacttctt taaaagtaag
1201 acacggtcac aatggaacag ttgttgatgt tgaattttta agccgtgata ctggtgatca
1261 acttgaagat ggaattgaaa aaatcgttta agtatcaatt gtcaaaaac gtaaaatcag
1321 agtcggcgac aaaatggctg gtcgtcatgg aaacaaagggt gttgtttcaa tcgtacttcc
1381 agttgaagaa atgccttatt tagaagatgg aacaccactg gatattttac ttaatcctca
1441 aggtgtacct tctcggatga acattggtca agttcttgaa cttgcacttg gaagtgcagc
1501 caaagtttta ggcacaaaat tcgcaacccc tatttttgat ggaattactc acaacaagt
1561 tcaagaaatt cttgaagaag caaaacttga tccatcagga aaagcttatg tttatagtgg
1621 acaaactggc gaaaaatttg ataatcctat ctcagttgga atcatgtatt atctaaaact
1681 ttaccacatg gttgatgaca aaatgcacgc tcgtagtggt ggaccttact cacttattac
1741 tcaacaacca cttggtggaa aaagccaaaa tgggtggacaa agatttg
```

Figura 4. Secuencia del gen *rpoB* de *Mycoplasma subdolum* y la ubicación de los iniciadores diseñados para obtener un producto de 235 pb

4.11 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés)

Los reactivos utilizados en la PCR, así como su concentración se muestran en el cuadro 6.

Cuadro 6. Reactivos¹³ utilizados para la reacción en cadena de la polimerasa de *Mycoplasma equigenitalium* y *Mycoplasma subdolum*

Reactivo	Concentración	Concentración final en la reacción
Taq polimerasa	1 UI	0.25 µl
Cloruro de Magnesio	50 mM	1.75 µl
Amortiguador 10 X	50 mM	2.5 µl
DNTP's	200 mM	1 µl
Primer F	20 pM	1 µl
Primer R	20 pM	1 µl
ADN	30-100 ng	5 µl
H ₂ O destilada		12.5 µl
Volumen final		50 µl

Las condiciones establecidas en el termociclador¹⁴ para la PCR de *M. equigenitalium* y *M. subdolum* se muestran en las figuras 5 y 6, respectivamente.

El producto de la PCR se observó en geles de agarosa al 2.5 %, los cuales se corrieron a 70 V por 1.30 h, se depositaron en una solución al 0.5 % de bromuro de etidio¹⁵ por 10 minutos y se utilizó un marcador de tamaño de 50 pb¹⁶ y de 1 kb¹⁷. Posteriormente, se observó en un transiluminador¹⁸ y después se llevó a un fotodocumentador¹⁹ para tomar la imagen.

¹³ Invitrogen

¹⁴ Techne 3000

¹⁵ Research Organics

¹⁶ Invitrogen

¹⁷ Invitrogen

¹⁸ High Performance Ultraviolet Transilluminator UVP (Ultraviolet Products)

¹⁹ Gel Logic 200 Imaging System Kodak

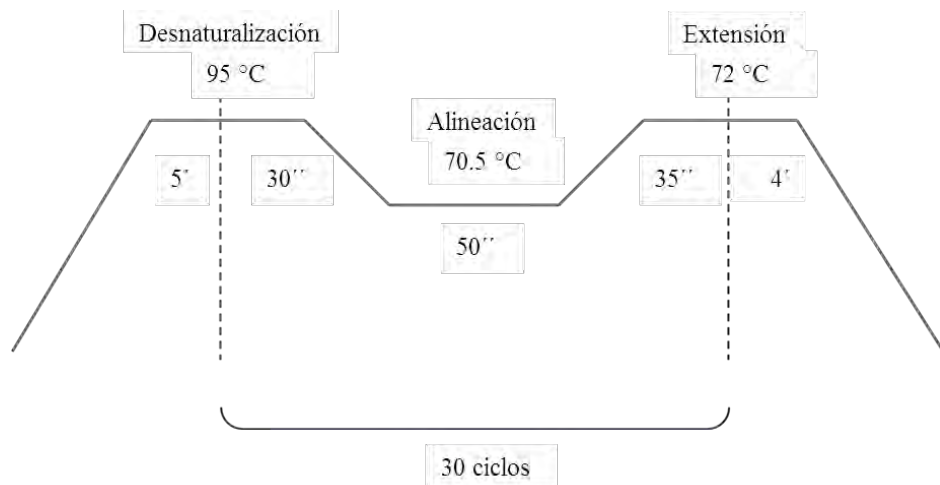


Figura 5. Condiciones de la PCR punto final para *Mycoplasma equigenitalium*

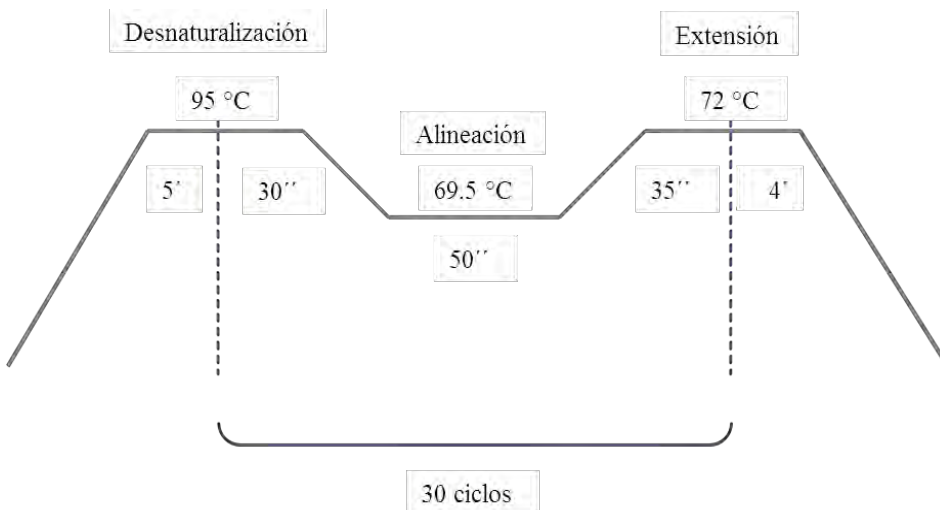


Figura 6. Condiciones de la PCR punto final para *Mycoplasma subdolum*

4.12 Aislamiento de bacterias aerobias del aparato reproductor de los equinos

4.12.1 Medios de cultivo

Se utilizaron los medios Agar Sangre y Agar Mac Conkey.

4.12.2 Procesamiento de las muestras

Los hisopos transportados en medio Stuart se inocularon en los medios de cultivo bacteriológicos e incubaron²⁰ por 24 hasta 72 h a 37° C en condiciones de aerobiosis. Las colonias desarrolladas fueron identificadas con pruebas primarias y complementarias como lo describen Carter *et al.*, en 1994 y Jang *et al.*, en 1982. Una muestra negativa se consideró luego de no observar desarrollo de colonias después de 72 h de incubación.

4.13 Pruebas serológicas para el diagnóstico de *Brucella abortus* y *Leptospira interrogans*

4.13.1 Prueba de tarjeta para *Brucella abortus*

Para la identificación de anticuerpos contra *Brucella abortus*, se utilizó la prueba de tarjeta al 3% y al 8%, como lo indica la norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995 “Campana Nacional contra la brucelosis en los animales”. La técnica consiste en verificar los testigos negativo y positivo antes de iniciar la prueba. Posteriormente, se tomaron 30 µl del suero problema y 30 µl del antígeno de *Brucella abortus*, se mezcló y realizó la lectura a los 4 minutos.

4.13.2 Prueba de Micro aglutinación Microscópica para *Leptospira interrogans*

Se utilizó la cepa de *Leptospira interrogans* con 12 serovariedades (Batavia, Bratislava, Hardjo-prajitno, Grippytyphosa, Pomona, Pyrogenes, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Celledoni, Wolffii, Automnalis y Tarassovi). Estas se cultivaron en medio líquido Ellinghausen & McCullough y modificado por Johnson & Harris (EMJH), suplementado con 1% de albúmina sérica bovina, se incubaron a 30 °C durante 8 a 12 días, hasta observar una turbidez comparativa al tubo de 0.5 del indicador McFarland.

²⁰ Incubadora Forma Scientific Marietta Ohio

Técnica de microaglutinación microscópica, se siguió el protocolo descrito por Myers 1985:

Inicialmente se realizó una prueba tamiz que consistió en colocar 50 µl de antígeno con 50 µl del suero problema. Posteriormente, se realizaron titulaciones de los sueros que tuvieron una aglutinación grado 2. Se hizo una dilución inicial 1:25 en solución salina fisiológica y a partir de esta se hicieron diluciones dobles seriadas desde 1:50 hasta 1:3200.

Todas las diluciones en 50 µl se depositaron en una placa de 96 pozos, se incubaron durante 1 hora a 30° C y realizó la lectura con un microscopio estereoscópico²¹. Se consideraron sueros positivos a los que obtuvieron una aglutinación grado 2 (50 % de leptospiras aglutinadas) en la dilución 1:100.

4.14 Análisis estadístico

Se utilizó la prueba de coeficiente de correlación de Spearman para conocer la relación entre las variables de aislamiento de *Mycoplasma* con aislamiento de bacterias aerobias asociadas a problemas reproductivos, nivel de anticuerpos contra *Leptospira* y *Brucella* y la evaluación de citologías endometriales.

²¹ Microscopio estereoscópico Leica

5 Resultados

5.1 Aislamiento de *Mycoplasma* spp.

Se obtuvieron 7/146 animales positivos al aislamiento de *Mycoplasma* spp., que representa el 4.79 % de la población estudiada. De estos animales los aislados se obtuvieron de: útero (3), de vagina (3) y de semen (1). Los aislados fueron tipificados como *Mycoplasma* spp., con las pruebas: dependencia de esteroides (digitonina), no reversión de formas L y filtración a través de membranas de diámetro de 0.45 μm .

5.2 Iniciadores dirigidos al gen *rpoB* para *Mycoplasma equigenitalium* y *Mycoplasma subdolum*

Los iniciadores dirigidos al gen *rpoB* son 100 % específicos para su respectiva especie probados con testigos que fueron *M. dyspar* y *M. bovis*.

5.3 Extracción de ADN

Con el método de tiocianato de guanidina para la obtención de ADN de las cepas de referencia y los aislados de campo de *Mycoplasma* spp., se obtuvieron rendimientos de 2 ng/ μl hasta 750 ng/ μl de ADN por cada 100 ml de medio de cultivo. Para su utilización en la PCR se diluyó el ADN hasta que se obtuvo una concentración entre 20 y 250 ng/ μl .

5.4 Identificación molecular con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa PCR

El producto obtenido en la PCR para *M. equigenitalium* fue de 294 pb (Figura 7) y para *M. subdolum* fue de 235 pb (Figura 8). Los resultados de la PCR a los aislados se detallan en el cuadro 7.

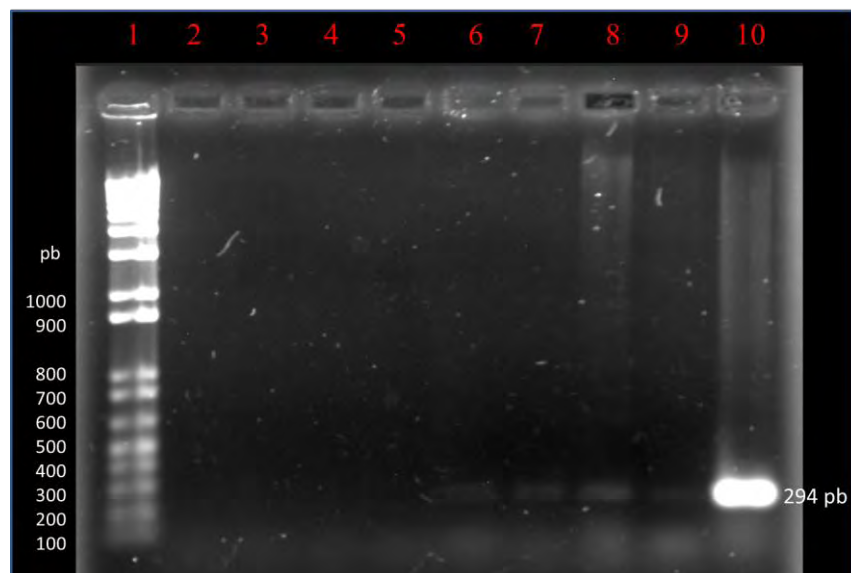


Figura 7. Productos de la PCR para *Mycoplasma equigenitalium*. 1: Marcador de tamaño de 1 kb, 2: testigo negativo: *M. subdolum*, 3: muestra de vagina 3, 4: muestra de útero 2, 5: muestra de útero 1, 6: muestra de útero 3, 7: muestra de vagina 2, 8: muestra de vagina 1, 9: muestra de semen y 10: control positivo *M. equigenitalium*

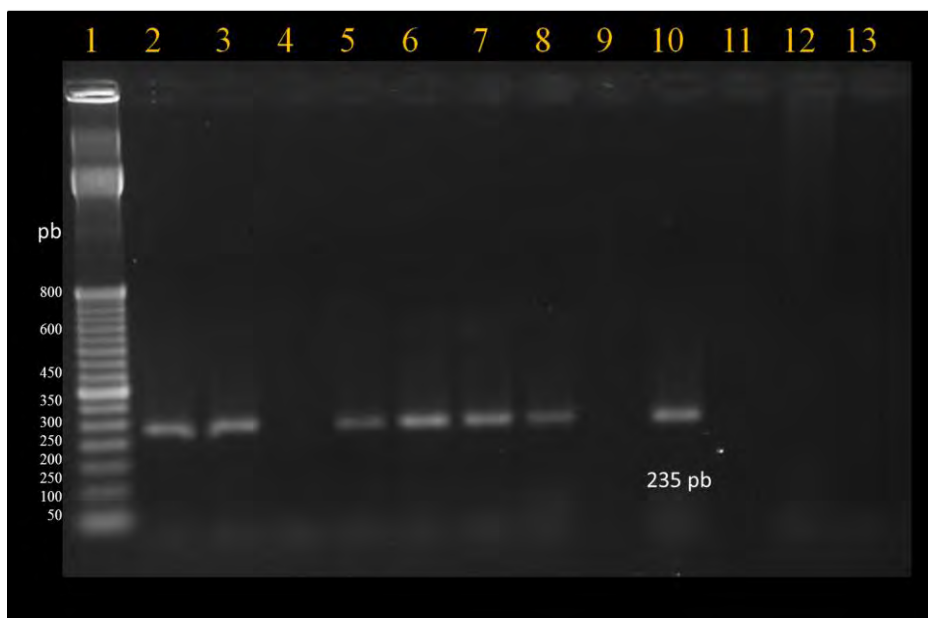


Figura 8. Productos de la PCR para *Mycoplasma subdolum*. 1: Marcador de tamaño de 50 pb, 2-4: muestras de útero, 5-7: muestras de vagina, 8: muestra de semen, 9: vacío, 10: testigo positivo *M. subdolum*, testigos negativos; 11: *M. equigenitalium*, 12: *M. bovis* y 13: *M. dyspar*

Cuadro 7. Resultado de la PCR para los aislados de *Mycoplasma spp.*

No. Muestra	Identificación	Sitio anatómico	<i>M. equigenitalium</i>	<i>M. subdolum</i>
1	1	Útero	-	+
2	7	Útero	+	-
3	120	Semen	+	+
4	67	Vagina	+	+
5	25	Útero	-	+
6	60	Vagina	+	+
7	95	Vagina	-	+

5.5 Aislamiento de bacterias aerobias del aparato reproductor en los equinos

En al menos 93 animales (63.69 %) presentaron aislamiento bacteriano a partir de útero o vagina o semen. De las muestras analizadas en al menos 49 hubo aislamiento bacteriano en hisopado de útero, 54 de hisopado de vagina y 10 de semen.

Las bacterias relacionadas con problemas reproductivos que se aislaron con mayor frecuencia fueron: *Acinetobacter calcoaceticus* (11.5 %) y *Escherichia coli* (8.4 %) en útero; *Acinetobacter calcoaceticus* (8.4 %), *Escherichia coli* (6.9 %) y *Klebsiella pneumoniae* (6.1 %) en vagina y *Staphylococcus coagulasa negativos* (SCN) (3 %) en el semen. En el cuadro 8 se enlistan la frecuencia de las bacterias aisladas.

Cuadro 8. Frecuencia de bacterias aerobias aisladas de equinos

Bacteria	Útero	Vagina	Semen
<i>Staphylococcus</i> CN	4	4	4
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ♣	15	11	
<i>Moraxella</i> spp	3	5	3
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	5	8	3
<i>Trueperella pyogenes</i> x	11	15	
<i>Staphylococcus aureus</i> ♣	1	2	1
<i>Bacillus</i> spp		3	3
<i>Escherichia coli</i> ♣	8	9	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ♣	5	8	
<i>Serratia</i> spp	2		
<i>Enterobacter</i> spp	4	2	
Total	58	67	16

♣ Bacterias asociadas a problemas reproductivos (Kirchoff 1978, Sperser *et al.*, 2002))

x Antes *Arcanobacterium pyogenes*

CN: coagulasa negativo

5.6 Prueba serológica para la detección de anticuerpos contra *Brucella abortus*

De los 146 sueros analizados para detectar anticuerpos contra *Brucella abortus* con la prueba de tarjeta en concentraciones del 3 y 8 %, del total de animales solo 7 (4.79 %) reaccionaron positivos a la prueba al 3 % y 4 de ellos (2.73 %) reaccionaron a la prueba al 8

% De estos 7 animales a 4 de ellos se les detecto anticuerpos en las dos concentraciones de la prueba.

Los animales que dieron positivo en esta prueba, todas fueron hembras. El promedio de edad de los animales positivos en esta prueba es de 8.7 años con una desviación estándar de 3.5.

5.7 Prueba serológica para la detección de anticuerpos contra *Leptospira interrogans*

Las serovariedades de *Leptospira* con mayor número de reactores positivos fue Bratislava con 130 de los 146 sueros (89.04 %) seguido de Autumnalis con 73 (50 %). La serovariedad relacionada con problemas reproductivos en equinos (principalmente aborto) es Pomona y esta se detectó en 28 sueros (19.17 %).

Las serovariedades que se observaron con mayor título 1:3200, fueron Bratislava, Grippytyphosa, Pyrogenes y Autumnalis, a partir de ocho animales que pueden encontrarse con una infección activa por *Leptospira*, es necesario considerar que la práctica de vacunación contra la leptospirosis en equinos no se realiza. En el Cuadro 9 se detalla la frecuencia de equinos seropositivos a las diferentes serovariedades de *Leptospira interrogans* mediante la técnica de aglutinación microscópica y en la figura 9 se observa la distribución de títulos por serovariedad.

Cuadro 9. Frecuencia de seropositividad a serovariedades de *Leptospira interrogans* en equinos

Serovariedades	Diluciones							Total
	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	
Bataviae	39	22	3	2	1			28
Bratislava	11	36	39	30	10	12	3	130
Canicola	20	26	20	9	5	2		62
Grippotyphosa	19	8	11	3	4	5	1	32
Hardjo-Prajitno	1	28	5	7	1			41
Icterohaemorrhagiae	19	24	15	5				44
Pomona	22	16	9		2	1		28
Pyrogenes	28	18	8	14	4	2	3	49
Tarassovi	13	7	2					9
Wolffi	18	10	4	2	1	1		18
Autumnalis	19	33	23	12	3	1	1	73
Celledoni	7	3						3
Total	216	231	139	84	31	24	8	

Nota: Existieron sueros que reaccionaron a más de una serovariedad

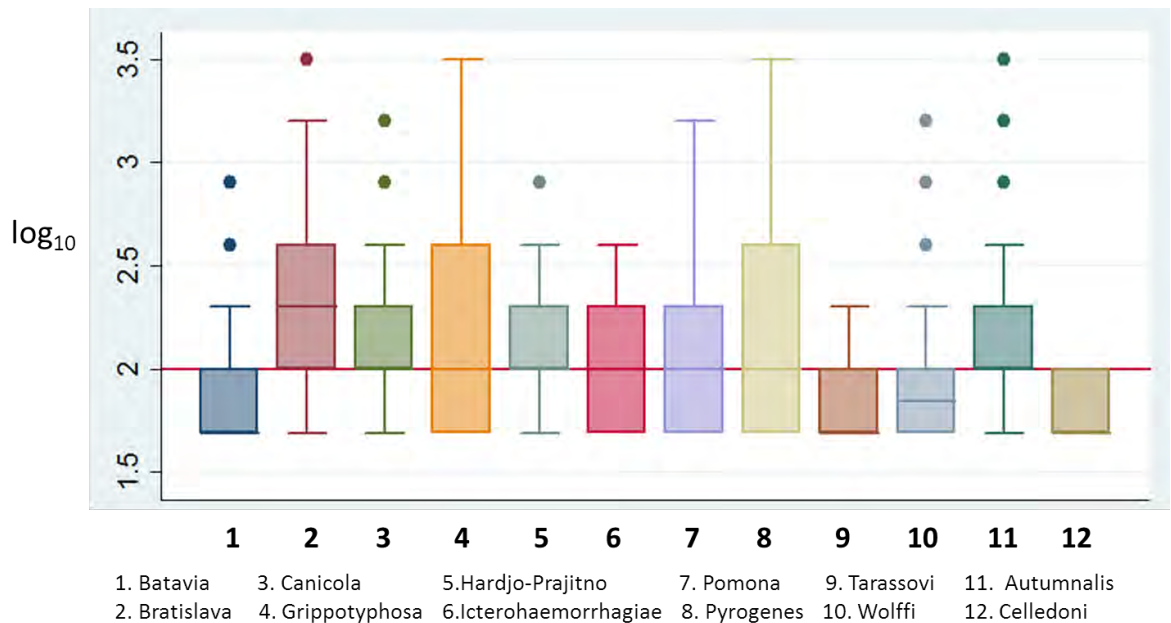


Figura 9. Distribución de los títulos obtenidos en las muestras de *Leptospira interrogans* (12 serovariedades), la línea roja representa el punto de corte.

5.8 Determinación de leucocitos polimorfonucleares

De las 130 laminillas analizadas, las células endometriales se observaron en buen estado y no se encontraron leucocitos polimorfonucleares, lo que indica ausencia de patología inflamatoria del endometrio al momento de la toma de la muestra (Figura 10 y 11).

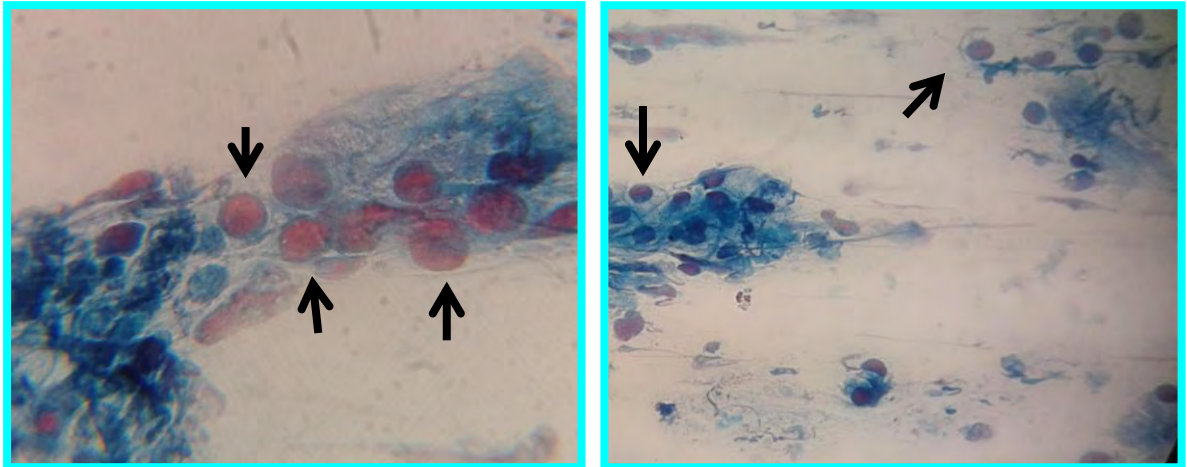


Figura 10 y figura 11. Identificación de células endometriales (flechas) en las citologías con tinción de Papanicolaou con objetivo 100 X y 40 X, respectivamente.

5.9 Análisis del coeficiente de correlación de Spearman (Rho)

5.9.1 Análisis de correlación entre la presencia de micoplasmas y otros géneros bacterianos aerobios

De acuerdo al análisis estadístico del coeficiente de correlación de Spearman, no existió correlación entre el aislamiento de micoplasmas y alguna bacteria patógena que ocasione problemas reproductivos, tomando en cuenta el valor de $p < 0.05$ con una $Rho = -0.004$, Cuadro 10.

Cuadro 10. Análisis de correlación entre la presencia de micoplasmas y bacterias aerobias en el aparato reproductivo de equinos

			<i>Mycoplasma</i>	Bacterias aerobias
Rho de	<i>Mycoplasma</i>	Coeficiente de correlación	1.000	-.004
		Sig. (bilateral)	.	.959
		N	146	146
Spearman	Bacterias aerobias	Coeficiente de correlación	-.004	1.000
		Sig. (bilateral)	.959	.
		N	146	146

5.9.2 Análisis de correlación entre la presencia de micoplasmas y seropositividad a *Brucella abortus*

Considerando el valor de $p < 0.05$ entre las variables existe una muy baja correlación entre los animales seropositivos a la prueba de tarjeta en las dos concentraciones utilizadas 3 y 8 % con una $Rho = 0.100$ con la presencia de micoplasmas, Cuadro 11.

Cuadro 11. Análisis de correlación entre la presencia de micoplasmas y seropositividad a *Brucella abortus*

			<i>Mycoplasma</i>	<i>Brucella abortus</i>
Rho de Spearman	<i>Mycoplasma</i>	Coeficiente de correlación	1.000	.100
		Sig. (bilateral)	.	.231
		N	146	146
	<i>Brucella abortus</i>	Coeficiente de correlación	.100	1.000
		Sig. (bilateral)	.231	.
		N	146	146

5.9.3 Análisis de correlación entre la presencia de micoplasmas y títulos de anticuerpos contra *Leptospira interrogans*

Considerando el valor de $p < 0.05$ entre las variables existe una muy baja correlación entre los animales reactivos positivos a la prueba de aglutinación microscópica en títulos de 1:100 para *Leptospira interrogans* serovariedad Pomona con una $Rho = .049$, Cuadro 12. Igualmente se consideraron las serovariedades Bratislava (Cuadro 13) y Autumnalis (Cuadro 14) por ser las serovariedades más frecuentes. De la misma manera, se analizaron a Grippothyposa (Cuadro 15) y Pyrogenes (Cuadro 16) por ser las serovariedades con el título más alto obtenido de 1:3200.

Cuadro 12 Análisis de correlación entre la presencia de micoplasmas y seropositividad a *Leptospira interrogans* serovariedad Pomona

		<i>Mycoplasma</i>	<i>L. interrogans</i> Pomona
Rho de Spearman	Coeficiente de correlación	1.000	.049
	<i>Mycoplasma</i> Sig. (bilateral)	.	.557
	N	146	146
	<i>Leptospira</i> Coeficiente de correlación	.049	1.000
	<i>interrogans,</i> Sig. (bilateral)	.557	.
	Pomona N	146	146

Cuadro 13 Análisis de correlación entre la presencia de micoplasmas y seropositividad a *Leptospira interrogans* serovariedad Bratislava

		<i>Mycoplasma</i>	<i>L. interrogans</i> Bratislava
Rho de Spearman	Coeficiente de correlación	1.000	-.013
	<i>Mycoplasma</i> Sig. (bilateral)	.	.873
	N	146	146
	<i>Leptospira</i> Coeficiente de correlación	-.013	1.000
	<i>interrogans,</i> Sig. (bilateral)	.873	.
	Bratislava N	146	146

Cuadro 14. Análisis de correlación entre la presencia de micoplasmas y seropositividad a *Leptospira interrogans* serovariedad Autumnalis

		<i>Mycoplasma</i>	<i>L. interrogans</i> Autumnalis
Rho de Spearman	Coeficiente de correlación	1.000	.032
	<i>Mycoplasma</i> Sig. (bilateral)	.	.701
	N	146	146
	<i>Leptospira</i> Coeficiente de correlación	.032	1.000
	<i>interrogans,</i> Sig. (bilateral)	.701	.
	Autumnalis N	146	146

Cuadro 15 Análisis de correlación entre la presencia de micoplasmas y seropositividad a *Leptospira interrogans* serovariedad Grippytyphosa

		<i>Mycoplasma</i>	<i>L. interrogans</i> Grippytyphosa
Rho de Spearman	Coeficiente de correlación	1.000	-.008
	<i>Mycoplasma</i> Sig. (bilateral)	.	.927
	N	146	146
	<i>Leptospira</i> Coeficiente de correlación	-.008	1.000
	<i>interrogans,</i> Sig. (bilateral)	.927	.
	Grippytyphosa N	146	146

Cuadro 16. Análisis de correlación entre la presencia de micoplasmas y seropositividad a *Leptospira interrogans* serovariedad Pyrogenes

		<i>Mycoplasma</i>	<i>L. interrogans</i> Pyrogenes
Rho de Spearman	Coeficiente de correlación	1.000	-.094
	<i>Mycoplasma</i> Sig. (bilateral)	.	.257
	N	146	146
	<i>Leptospira</i> Coeficiente de correlación	-.094	1.000
	<i>interrogans,</i> Sig. (bilateral)	.257	.
	Pyrogenes N	146	146

5.9.4 Análisis de correlación entre la presencia de micoplasmas y la edad de los animales en estudio

Se realizó el análisis de correlación para la presencia de micoplasmas y la edad de los animales con una $p < 0.05$ obteniendo un rho de 0.087, lo que resulta en no existir relación entre estas variables (Cuadro 17).

Cuadro 17. Análisis de correlación entre la presencia de micoplasmas y edad de los animales

		<i>Mycoplasma</i>	Edad
Rho de Spearman	Coeficiente de correlación	1.000	.087
	<i>Mycoplasma</i> Sig. (bilateral)	.	.296
	N	146	146
	Coeficiente de correlación	.087	1.000
	Edad Sig. (bilateral)	.296	.
	N	146	146

6 Discusión

Actualmente se debe considerar que es necesaria una buena limpieza del aparato reproductor de las hembras y machos, antes y después de una monta natural o inseminación artificial por parte de especialistas en reproducción de equinos a fin de evitar infecciones cervico-uterinas, puesto que si las condiciones de incompetencia cervical, actividad miometrial y drenaje linfático, se encuentran afectadas las hembras no pueden eliminar las bacterias y restos de semen y desarrollan una infección o inflamación (Katila 1996).

Le Blanc y Causey, en el 2009, mencionan que al existir daño en el aparato reproductor en las hembras, estas son más vulnerables a una infección uterina o aborto, dentro de las lesiones consideran una endometritis persistente, una mala conformación perianal, malformación en el cérvix por manipulación y otro factor a considerar es la edad.

6.1 Aislamiento de *Mycoplasma* spp.

De los 146 animales analizados en este estudio, se observó una frecuencia del aislamiento de *Mycoplasma* spp., de 4.8 %. Los aislamientos se obtuvieron principalmente de muestras de útero, vagina y semen.

El método de hisopado seleccionado es el recomendado para el aislamiento bacteriano de útero en yeguas (Dascanio *et al* 1997), pero tal vez por el hecho de realizar el raspado en una zona reducida de la mucosa del útero y/o vagina, es lo que nos limita a aislar a bacterias en mayor proporción y por eso tener tan poco aislamiento de esta bacteria. En el caso de las muestras de semen el procedimiento fue el adecuado, igualmente se obtuvo muy poco aislamiento de este género bacteriano (Tiago *et al.*, 2012).

En un estudio similar realizado en Argentina, se aisló a *Mycoplasma equigenitalium* en el 6.25 % de 16 yeguas con historia de infertilidad, la diferencia fue que el tipo de muestra que tomaron estos investigadores fue un lavado de útero de las yeguas en época de anestro

(Copes *et al.*, 1995); sobre el uso de lavados para aislamiento bacteriano no se tienen informes comparado con el uso de hisopados.

En otro trabajo, Baczinska *et al.*, en 2007, en Dinamarca, procesaron 18 muestras de hisopos vaginales y 83 muestras de semen para el aislamiento de micoplasmas e identificación por la PCR con iniciadores dirigidos hacia el gen 16S rRNA, ellos determinaron que los animales fueron negativos a *Mycoplasma* spp., en el aislamiento y en la identificación molecular.

Los porcentajes bajos encontrados en este trabajo (4.8 %) y en el de Argentina (6.25 %) aunado al trabajo realizado en Dinamarca donde no encontraron micoplasmas en yeguas o sementales no es indicativo de restarle valor a este microorganismo ya que estudios realizados por Bermúdez *et al.*, en 1992, mostraron la importancia de la patogenicidad de los micoplasmas asociados a problemas reproductivos, ellos trabajaron con aislados obtenidos a partir de placenta de fetos abortados, de una yegua con endometritis y de un semental con subfertilidad, de este último observaron que la cepa causó daño *in vitro* a células de oviducto de yeguas, por lo que, su presencia en el aparato reproductor de la hembra por monta directa o semen debe considerarse como un factor de disminución en la fertilidad; el fundamento de los estudio en células de órganos *in vitro* ,es talvez, el método experimental más similar a las condiciones *in vivo*, sin embargo, estudios en animales infectados con este microorganismo serán necesarios para evaluar su comportamiento y de esta forma obtener mejores hallazgos sobre la importancia de esta bacteria en el aparato reproductor de los equinos dedicados a la cría. En relación a ello, Razin *et al.*, en 1998, comunican que debe realizarse mayor investigación encaminada a la evaluación de los mecanismos de virulencia y patogenicidad, así como, al estudio de la interacción de esta bacteria con el sistema inmune del huésped, pues a la fecha no existen informes sobre estos temas.

6.2 Identificación molecular de *Mycoplasma*

De acuerdo a la PCR se identificó a *M. equigenitalium* en el 2.73 % de las muestras analizadas y a *M. subdolum* en el 4.10 %.

Mediante el empleo de esta técnica se puede acortar el tiempo para obtener el resultado de diagnóstico en el laboratorio, hasta la mitad de lo que tarda el método convencional de aislamiento que son 30 días naturales, además la especificidad de la prueba estandarizada fue del 100% con los iniciadores diseñados para cada una de las especies estudiadas.

En cuatro cultivos positivos a *Mycoplasma* spp., se determinó la coexistencia de *M. equigenitalium* y *M. subdolum* por la técnica de PCR, pese haber realizado el proceso de separación de colonias por clonación de los cultivos, se puede referir que desde 1988 Bermúdez *et al.*, describen la presencia de cultivos mixtos en muestras de hisopado de la fosa del clítoris en yeguas, similar a lo observado en este estudio.

Pocos estudios se han realizado con pruebas moleculares para la identificación de bacterias del género *Mycoplasma* en muestras de equinos que puedan ser utilizados como referencias en el presente estudio.

El estudio más actual realizado por Baczynska *et al.*, en 2007, citan el uso de iniciadores dirigidos hacia el gen 16S ARNr del género *Mycoplasma*, la desventaja de utilizar esta prueba es que no se puede conocer la especie o especies presentes en las muestras.

Otra referencia sobre el uso de la PCR en equinos dedicados a la reproducción lo realizaron Spergser *et al.*, en 2002, colectaron muestras de hisopado de la uretra, fosa del glande, semen y líquido pre eyaculatorio de 116 sementales en Austria, pero el protocolo que utilizaron para la identificación de ácidos nucleicos, correspondía a la clase Mollicutes, la desventaja es que los iniciadores diseñados identifican a cuatro órdenes, incluyendo a los

Mycoplasmatales, dificultando la orientación del tratamiento y el conocimiento del agente etiológico presente.

6.3 Aislamiento de bacterias aerobias

Realizar un diagnóstico bacteriológico general y específico de útero y semen, permite mejorar los programas de reproducción, se menciona que las áreas externas del pene del semental pueden ser reservorios de microorganismos patógenos y ser la vía de ingreso al aparato reproductor de la hembra, por monta natural o inseminación artificial (Metcalf 2001, Baczynska *et al.*, 2007, Lu y Morresey, 2007).

Las bacterias mayormente aisladas de muestras de útero y vagina fueron: *Acinetobacter calcoaceticus*, *Trueperella pyogenes*, *Corynebacterium pseudotuberculosis* y enterobacterias, en tanto que, de semen se aisló, aunque en porcentaje relativamente bajo *Staphylococcus coagulasa negativo* (SCN), *Moraxella* spp., y *C. pseudotuberculosis*.

En lo referente a *Acinetobacter calcoaceticus* existe información de su aislamiento de hisopados de cérvix, de fetos abortados y placentas de equinos (Carter *et al.*, 1970, McArdle *et al.*, 1978), es necesario, evaluar la presencia de este microorganismo en el aparato reproductor de los equinos, así como, los mecanismos de patogenicidad de esta bacteria.

Para *Escherichia coli* se ha informado de su aislamiento de yeguas con problemas reproductivos, tanto de hisopados y de lavados de útero como de biopsias endometriales (Albihn *et al.*, 2003, Moller 2005, Ball *et al.*, 1988), bacteria de gran relevancia en endometritis en yeguas.

Trueperella pyogenes se ha aislado de lavados uterinos (Brooksby *et al.*, 1969, Millar 1974, Sanousi 1979, Parraguirre 2003) y de membranas fetales de potros (Juárez - Cortés *et al.*, 2008), es habitante normal de membranas mucosas y actúa como patógeno oportunista

provocando infecciones purulentas en piel, articulaciones y órganos internos Clerc *et al.*, 2004).

De *Klebsiella pneumoniae* se señala ser un patógeno oportunista, no obstante, puede causar vaginitis y metritis en yeguas, reduciendo la fertilidad (Farina y Scatozza, 1988). También, se refiere ser un comensal de la zona externa del pene, sin embargo, al ser transmitida presuntamente por el semen ocasiona problemas de infertilidad en las yeguas (Samper y Tibary, 2006; Lu y Morrese, 2007, Ortega-Ferrusola *et al.*, 2009). Además, puede encontrarse con una frecuencia de un 2.1 % en placentas (Hong *et al.*, 1993) y aislarse de mucosa uterina (Albihn *et al.*, 2003). Recientemente, Burlison *et al.*, en 2010, asociaron el aislamiento de esta bacteria con un aumento de líquido uterino en un 45 - 55 % de las yeguas que estudiaron. Por último, se menciona que puede aislarse de líquido amniótico y de contenido gástrico en potros (LeBlanc *et al.*, 2012).

A *Staphylococcus coagulasa* negativo se ha aislado de hisopados de mucosa uterina en yeguas (Albihn *et al.*, 2003), así como, de hisopos nasales en equinos sanos, pero se desconoce que provoca en el aparato reproductor de equinos (Mallardo *et al.*, 2013).

Concerniente a bacterias del género *Moraxella* hasta la fecha no se ha encontrado literatura que cite a este microorganismo como flora o agente oportunista en el tracto reproductor de las yeguas o en el aparato reproductor de sementales, pero si se ha informado en membranas fetales de potros (Juárez-Cortés *et al.*, 2008).

Respectivo a *Corynebacterium pseudotuberculosis* se ha encontrado en hisopados de útero en yeguas (Kakansson *et al.*, 1993, Albihn *et al.*, 2003). También se puede encontrar en semen fresco y congelado (Ortega-Ferrusola *et al.*, 2009; Corona y Cherchi, 2009) y en líquido seminal, por lo que, se puede señalar que se transmita durante la monta o inseminación con semen fresco (Held 1990).

Concerniente a *Bacillus* spp., se sabe que es flora normal en el tracto reproductivo de las yeguas (Scott *et al.*, 1971, Bribiesca 1980, Parraguirre 2003). A *Serratia* spp., se le ha encontrado en membranas fetales de potros y la especie de *S. marcescens* se asocia con aborto (Jores *et al.*, 2004, Juárez-Cortés *et al.*, 2008).

Por último de *Enterobacter* spp., se alude que la especie *aerogenes* ha sido aislada de hisopado de mucosa uterina en yeguas (Albihn *et al.*, 2003), no hay informes donde se indique su participación en problemas reproductivos en equinos.

Entonces, tanto en las hembras como en los machos es esencial mantener una buena higiene de las zonas externas del aparato reproductor, de este modo puede evitarse la transmisión de bacterias y evitar su posible participación en problemas en los equinos.

6.4 Prueba serológica para la detección de anticuerpos contra *Brucella* en equinos

La brucelosis es una zoonosis que es difícil de diagnosticar en humanos, la sintomatología es confusa y el aislamiento del microorganismo es lento, por ejemplo, en México durante el período de 1968 a 1991 se realizó un trabajo para aislar a varias especies de *Brucella* en muestras de personas y se obtuvo un total de 252 cepas, de *Brucella abortus* se refieren 81 aislamientos, lo que refleja una posible transmisión del contacto con animales infectados (Lucero *et al.*, 2008). También es relevante mencionar que una infección puede deberse a la ingestión de alimentos contaminados (Mailles *et al.*, 2012).

En equinos dedicados a la cría, una infección de *Brucella abortus*, desencadena aborto en las hembras e infertilidad en los sementales, en consecuencia el contacto con animales infectados puede ser una vía de transmisión al humano (Mair y Divers, 2009).

De los 146 sueros obtenidos, 4 reaccionaron a la prueba de tarjeta en las dos concentraciones utilizadas: 3 % y 8 %, otros 3 sueros reaccionaron sólo al 3 %. Es propio

mencionar que no se ha determinado la concentración adecuada para realizar la prueba de tarjeta en los equinos, durante el 2006, en un estudio realizado en el estado de Tamaulipas por Acosta-González *et al.*, en el 2005, determinaron una seroprevalencia del 23 %, los animales positivos reaccionaron a la prueba de tarjeta en una concentración al 8 %, en otro estudio se informó un 14.6 % pero esta cifra comprende una población de equinos, burros y mulas (Omer *et al.*, 2000). Si se toman a los 7 animales positivos al 3 % obtenemos una frecuencia del 4.79 %, cifra que es muy baja comparada con la indicada en el estudio del 2006.

Los animales positivos en esta prueba, fueron hembras; 5 de ellas tenían antecedentes de problemas y 2 eran del grupo de animales sanos.

En este trabajo la edad promedio de los animales que reaccionaron a la prueba es de 8.7 años, comparado a un estudio en Caldas, Colombia se comunica un promedio similar de 7 años (Aricapa *et al.*, 2008).

En México, realizar la prueba de tarjeta en los equinos de centros de reproducción no es un estudio de rutina, por lo que, orientar a los médicos sobre la presencia de esta bacteria en los equinos es vital por el riesgo que representa una infección. Por ejemplo, en un estudio realizado en la universidad de el Cairo durante el 2002, se puntualiza la transmisión de esta bacteria a médicos veterinarios y criadores al tener contacto con animales infectados, también se comunica la infección en el personal de laboratorio que realiza el diagnóstico, esto se determinó al realizar pruebas de serología en todo el personal cercano a los animales (técnicos de laboratorio, personal de rastros de caballos y veterinarios) (Refai, 2002).

6.5 Prueba serológica para la detección de anticuerpos contra *Leptospira interrogans* (12 serovariedades)

Los resultados de este estudio resaltan la necesidad de contar con un sistema de vigilancia hacia la leptospirosis, pues se ha identificado la transmisión de la bacteria hacia médicos

veterinarios y personal que labora con los animales (Pavan *et al.*, 2011), en humanos se ha observado la reacción en muestras de suero hacia las serovariedades: Ballum, Canicola, Icterohaemorrhagiae y Pyrogenes (Vanasco *et al.*, 2000).

En los equinos la leptospirosis origina: uveítis, aborto, muerte fetal, parto prematuro, disfunciones renales y hepáticas en potros (León *et al.*, 2006). Los signos clínicos comunes en potros son: nefritis supurativa y no supurativa, hemorragias pulmonares, neumonía y miocarditis, trombosis, vasculitis y meningitis (Poonacha *et al.*, 1993).

La serovariedad Pomona es la más involucrada con problemas reproductivos en los equinos, se menciona que se puede encontrar en aislamientos de tejidos fetales hasta en un 85 %, (Donahue *et al.*, 1992), el aborto ocurre con un 15.6 % durante el 6to al 9no mes, las lesiones macroscópicas en cada placenta son diferentes y el diagnóstico se puede confirmar con histología, en los fetos abortados se encuentran anticuerpos hasta en un 85.7 % con la prueba de aglutinación microscópica (Hong *et al.*, 1993, Sheoran *et al.*, 2000).

En el presente estudio se encontró la serovariedad Pomona en 28 animales que reaccionaron con títulos >1:100 (19.17 %). De los cuales 17 animales tuvieron problemas y 11 eran sanos, con lo que es difícil determinar si esta bacteria puede ser el posible agente involucrado en sus complicaciones. Actualmente ya se cuenta con una técnica molecular (PCR punto final) dirigida hacia la serovariedad Pomona y se ha propuesto como técnica opcional para la identificación de esta bacteria en los equinos y otros mamíferos (Timoney *et al.*, 2011).

También en este estudio se determinó con mayor prevalencia las serovariedades Bratislava y Autumnalis, es relevante mencionar que se pueden encontrar títulos altos de una o más serovariedades en el suero de un animal. De la serovariedad Bratislava se han mostrado títulos en un 5 % en líquidos fetales con la prueba de aglutinación microscópica (Donahue *et al.*, 1992), pero de la serovariedad Autumnalis, es el primer trabajo en el que se informa la presencia de anticuerpos en los sueros analizados.

En cuestión de títulos, Bratislava, Grippytyphosa, Pyrogenes y Autumnalis, fueron serovariedades que presentaron títulos hasta 1:3200, en Inglaterra se obtuvieron los mismos títulos en la serovariedad Bratislava, pero los animales no referían signos, por lo que, se especula que cursaban una infección subclínica (Houwens *et al.*, 2011). La serovariedad Grippytyphosa ya ha sido orientada en equinos, al igual que Hardjo e Icterohemorragiae (Donahue *et al.*, 1992).

Pinna *et al.*, en 2011, citan la eficiencia de la técnica de la PCR para identificar al género *Leptospira* contra la prueba de aglutinación microscópica, en su investigación detectaron títulos de anticuerpos 1:800 contra la serovariedad Copenhageni, en las yeguas como en sus respectivos potros y además identificaron a la bacteria en el líquido torácico de los fetos abortados, con lo que, se obtuvo una buena relación entre las pruebas.

Hamond *et al.*, en el 2013, sugieren que los equinos son hospederos primarios esenciales en la persistencia de focos de infección y que se pueden transmitir a los humanos, situación que ha originado el desarrollo de técnicas moleculares. Abordando sobre los problemas reproductivos, recientemente se demostró con la técnica de la PCR a *Leptospira* en un 37.5 % en el líquido gástrico de fetos abortados (Hamond *et al.*, 2012), entonces si tenemos la presencia de esta bacteria en el feto, es necesario identificar la presencia de esta bacteria en el útero de las yeguas de forma más rápida que el aislamiento, la técnica que podría utilizarse sería la PCR.

6.6 Leucocitos polimorfonucleares

Un diagnóstico citológico puede evidenciar inflamación pero no infección, así lo cita Aitken en el 2012, en su estudio aisló a *Escherichia coli* de útero y en su respectiva citología no evidenció la presencia de leucocitos polimorfonucleares. Estas células en el tejido establecen una respuesta inflamatoria, en yeguas normales se pueden encontrar hasta 1 hora después de la inseminación artificial o de una infección experimental, se indica que

en yeguas sanas el número de células debe disminuir en 48 horas después de la inseminación artificial (Katila 1996).

Si ocurre una falla en el mecanismo de defensa del útero (por la presencia de neutrófilos ineficientes que no pueden fagocitar a las bacterias o espermatozoides); una disminución en la contractilidad uterina para eliminar líquido y establecemos un factor más que es la edad y número de partos de la yegua por consecuencia se presenta una endometritis persistente; de la cual se reconocen cuatro condiciones con las que se puede desarrollar: 1. Enfermedad transmitida sexualmente, 2. Persistencia de una infección uterina, 3. Endometritis persistente inducida por la monta y 4. Endometritis crónica degenerativa que lleva a que el útero desarrolle una endometriosis (Troedsson 1999). Esto es, finalmente el resultado de una respuesta inflamatoria por la migración de neutrófilos, inmunoglobulinas y complemento dentro del lumen uterino en respuesta al semen, las yeguas susceptibles acumulan líquido dentro del útero que contiene semen, proteínas y bacterias, manteniendo una inflamación y edema, el endometrio se irrita y si la inflamación es crónica se desarrolla una fibrosis lo que desarrollará tejido de cicatrización dando como resultado un medio inhóspito para el embrión cuando este desciende al útero (LeBlanc 2010).

Riddle *et al.*, en 2007 han demostrado que no existe relación entre el aislamiento de un agente patógeno y la presencia de leucocitos polimorfonucleares en las citologías, en 36 % de los cultivos positivos su citología fue negativa y en un 65 % de citologías positivas el aislamiento fue negativo.

Le Blanc, en 2010 demostró que existe una relación entre la presencia de líquido uterino y los aislamientos de bacterias relacionadas con problemas reproductivos con la presencia de neutrófilos en las citologías, además puntualiza que no todas las bacterias presentes en el útero inducen una respuesta inflamatoria aguda y que el líquido uterino no necesariamente es resultado de una infección bacteriana.

En el presente estudio no se observó evidencia de leucocitos polimorfonucleares, lo que indica ausencia de una patología inflamatoria del endometrio, en parte puede ser por la influencia hormonal que modifica los estándares celulares y el momento de la toma de muestra que fue realizada aproximadamente en los primeros tres días del estro (Snider *et al.*, 2011).

Actualmente, se menciona que la técnica de citología con hisopo ha sido superada por el uso de un cepillo, que incrementa de un 50 % a un 75 % el diagnóstico de un proceso inflamatorio (Cocchia *et al.*, 2012), la limitante de emplear el cepillo citológico para toma de muestras es el elevado costo alrededor de cuatro veces más que el de un hisopo de doble protección.

Los exámenes citológicos o bacteriológicos, por si solos se ha notificado demuestran resultados negativos y que la combinación de estos estudios mejoran el diagnóstico en las yeguas con problemas, con lo que es recomendable utilizar ambas pruebas de rutina (Overbeck *et al.*, 2011).

6.7 Análisis del coeficiente de correlación de Spearman

6.7.1 Correlación del aislamiento de *Mycoplasma* y las bacterias aerobias aisladas

No se observó relación entre el aislamiento de *Mycoplasma* y bacterias aerobias patógenas, tales como, *Escherichia coli*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*, pero es necesario realizar más trabajos que aporten información de cómo evitar la diseminación de estos microorganismos en los centros de reproducción.

6.7.2 Correlación del aislamiento de *Mycoplasma* y la prueba serológica para *Brucella*

No se encontró relación entre el aislamiento de *Mycoplasma* y *Brucella*, sin embargo, encontramos animales seropositivos, con lo que, es necesario tomar precauciones al trabajar con estos animales para evitar una infección, así como, determinar la concentración adecuada para diagnosticar este microorganismo en los animales y en un futuro desarrollar otras técnicas de detección más específicas para esta especie.

6.7.3 Correlación del aislamiento de *Mycoplasma* y la prueba de Microaglutinación de *Leptospira interrogans*

En la frecuencia obtenida de *Mycoplasma equigenitalium* y *Mycoplasma subdolum*, no existe relación entre la serovariedad Pomona, que es la serovariedad relacionada en abortos. Se concluye que se encontró a las serovariedades Bratislava, Grippytyphosa, Pyrogenes y Autumnalis con títulos 1:3200, sin embargo, hasta el momento se desconoce qué lesiones causan en los equinos, también es importante mencionar que el encontrar títulos altos no significa que los animales estén cursando una infección, por lo que, se necesitan estudios encaminados a conocer el estado clínico de los animales en relación al título obtenido en la prueba.

6.7.4 Correlación del aislamiento de *Mycoplasma* y la edad de los animales

La edad promedio de los animales con aislamiento de *Mycoplasma* en este estudio fue de 11 años y la edad promedio de los animales sin desarrollo fue de 9 años, lamentablemente no existe literatura en donde citen si la edad puede contribuir a encontrar este microorganismo, por otra parte, es necesario de ser posible evaluar esta variable en futuros trabajos de investigación.

A manera de conclusiones, se pueden señalar los siguientes puntos como los más importantes:

- 🐎 El uso de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa para identificar a las especies de *M. equigenitalium* y *M. subdolum*, puede ser utilizada como un método de diagnóstico en los equinos obteniendo su resultado rápidamente
- 🐎 Se encontró presencia de bacterias aerobias involucradas con infecciones, por lo que, se sugiere realizar una adecuada asepsia de la zonas externas en los equinos
- 🐎 Al encontrar animales positivos en pruebas serológicas a los agentes *Brucella abortus* y *Leptospira interrogans*, se hace hincapié en desarrollar medidas de prevención para evitar la transmisión de estos microorganismos al humano
- 🐎 En las citologías respectivas a los animales con aislamiento de *Mycoplasma* spp., no se observó inflamación del endometrio

7 Literatura citada

- Acosta-González RI, González-Reyes I y Flores-Gutiérrez GH. Prevalence of *Brucella abortus* antibodies in equines of a tropical region of Mexico. *Can J Vet Res* 2006;70:302-304.
- Albihn A, Baverud V y Magnusson U. Uterine microbiology and antimicrobial susceptibility in isolated bacteria from mares with fertility problems. *Acta Vet Scand.* 2003;44:121-129.
- Aricapa HJ, Jaramillo A, Pérez JE, Londoño L, Castrillón A, Amaya C, Murillo JM, Largo J, Alzate E, Buitrago F, Feris J, Gallego M, Hurtado JM, Orozco J, Hernández JF, Martínez A y Sánchez F. Prevalencia de brucelosis bovina, equina y humana en Caldas – Colombia – Sur América. ISSN 1675-9550. *Biosalud* 2008;7:75-87.
- Baczynska A, Fedder J, Schougaard H y Christiansen G. Prevalence of mycoplasmas in the semen and vaginal swabs of Danish stallions and mares. *Vet Microbiol* 2007;121:138-143.
- Bermudez V, Miller R, Johnson W, Rosendal S y Ruhnke L. Recovery of *Mycoplasma* spp. from the reproductive tract of the mare during the estrous cycle. *Can J Vet Res* 1987;28:519-522.
- Bermudez V, Miller RB, Johnson W, Rosendal S y Ruhnke L. Effect of sample freezing on the isolation of *Mycoplasma* spp. from the clitoral fossa of the mare. *Can J Vet Res* 1988;52:147-148.
- Bermúdez VM, Miller RB, Rosendal S, Fernando MA, Johnson WH, O'Brien PJ. Measurement of the cytotoxic effects of different strains of *Mycoplasma equigenitalium* on the equine uterine tube using a calmodulin assay. *Can J Vet Res.* 1992;56:331-8
- Bischof DF, Janis C, Vilei EM, Bertoni G, Frey J. Cytotoxicity of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type to bovine epithelial cells. *Infect Immun.* 2008;76:263-269.
- Butt AM, Tahir S, Nasrullah I, Idrees M, Lu J y Tong Y. *Mycoplasma genitalium*: a comparative genomics study of metabolic pathways for the identification of drug and vaccine targets. *Infect Genet Evol.* 2012;12:53-62.
- Caro RR y Gitiérrez LR. Prevención de enfermedades infecciosas en equinos. *Vet Arg Bs As* 1999;16:392-606. Tomado de www.produccion-animal.com.ar.

- Carter GR y Wise DJ. Essentials of Veterinary Bacteriology. 6 ed. Ed. 2004. 518 pp.
- Chalker VJ. Canine micoplasmas. Res Vet Sci. 2005;79:1-8.
- Chambaud I, Wróblewski H y Blanchard A. Interactions between *mycoplasma* lipoproteins and the host immune system. Trends Microbiol. 1999;7:493-499.
- Citti C, Watson-McKown R, Drosesse M y Wise KS. Gene families encoding phase- and size-variable surface lipoproteins of *Mycoplasma hyorhinis*. J Bacteriol. 2000;182:1356-1363.
- Clerc PK, Cordero F, Saldivia CM, Vásquez LA y García ML. Facial abscesses produced by *Actinomices pyogenes* (*Arcanobacterium pyogenes*) in a senepol bull. Rev Fac Cs Vets. 2004;45:1-8.
- Cocchia N, Paciello O, Auletta L, Uccello V, Silvestro L, Mallardo K, Paraggio G y Pasolini MP. Comparison of the cytobrush, cottonswab, and low-volume uterine flush techniques to evaluate endometrial cytology for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. Theriogenology. 2012;77:89-98.
- Copes C, Blanco A, Giacoboni G, Stanchi N, Cerda R y Victorio N. Aislamiento de *Mycoplasma equigenitalium* a partir de yeguas. Avances de Medicina Veterinaria, Norteamérica, 1030 09 2010. Consultado el sept27, 2012 de <http://www.avancesveterinaria.uchile.cl/index.php/ACV/article/viewArticle/4751/4636>.
- Corona A y Cherchi R. Microbial quality of equine frozen semen. Anim Reprod Sci. 2009;115:103-109.
- Costa J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2004;22:299-305.
- Daniel WW. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. 4 ed. Ed. Limusa Wiley. 2006. 783 pp.
- Dascanio J, Ley WB y Bowen JM. How to perform and interpret uterine cytology. Proceedings of the Annual Convention of the AAEP 1997;43:182-186.
- Davies Morel MC, Newcombe JR y Hinchliffe J. The relationship between consecutive pregnancies in Thoroughbred mares. Does the location of one pregnancy affect the location of the next, is this affected by mare age and foal heat to conception interval or related to pregnancy success. Theriogenology. 2009;71:1072-1078.

- Diario Oficial, Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Jueves 20 de septiembre de 2007. Pág. 9.
- Dienes L. Electron micrographs made from L forms of *Proteus* and two human strains of pleuropneumonia-like organisms. J Bacteriol. 1953;66:280-286.
- Doig PA, McKnight JD y Miller RB. The use of endometrial biopsy in the infertile mare. Can Vet J. 1981;22:72-76.
- Dybvig K y Voelker LL. Molecular biology of Mycoplasmas. Annu Rev Microbiol. 1996;50:25-57.
- Eisenstein BI y Schaechter M. Biota microbiana normal. Microbiología: Mecanismos de las enfermedades infecciosas. Editorial Médica Panamericana. 2da ed. 1994. Uruguay. Pp. 35-40.
- Fleury B, Bergonier D, Berthelot X, Peterhans E, Frey J y Vilei EM. Characterization of P40, a cytoadhesin of *Mycoplasma agalactiae*. Infect Immun 2002;70:5612-5621.
- Hamond C, Martins G, Lawson-Ferreira R, Medeiros MA y Lilenbaum W. The role of horses in the transmission of leptospirosis in an urban tropical area. Epidemiol Infect. 2013;141:33-35.
- Hamond C, Martins G, Lilenbaum W y Medeiros MA. Rapid and efficient diagnosis of leptospirosis in an aborted foal by PCR of gastric juice. Vet Microbiol. 2012;160:274-275.
- Hayflick L y Chanock RM. *Mycoplasma* species of man. Bacteriol Rev. 1965;29:185-221.
- Hemberg E, Lundeheim N y Einarsson S. Retrospective study on vulvar conformation in relation to endometrial cytology and fertility in thoroughbred mares. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med. 2005;52:474-477.
- Hong CB, Donahue JM, Giles RC Jr, Petrites-Murphy MB, Poonacha KB, Roberts AW, Smith BJ, Tramontin RR, Tuttle PA y Swerczek TW. Equine abortion and stillbirth in central Kentucky during 1988 and 1989 foaling seasons. J Vet Diagn Invest. 1993;5:560-566.
- Hong CB, Donahue JM, Giles RC Jr, Petrites-Murphy MB, Poonacha KB, Roberts AW, Smith BJ, Tramontin RR, Tuttle PA y Swerczek TW. Etiology and pathology of equine placentitis. J Vet Diagn Invest. 1993;5:56-63.

- 🌐 Houwers DJ, Goris MG, Abdoel T, Kas JA, Knobbe SS, van Dongen AM, Westerduin FE, Klein WR y Hartskeerl RA. Agglutinating antibodies against pathogenic *Leptospira* in healthy dogs and horses indicate common exposure and regular occurrence of subclinical infections. *Vet Microbiol.* 2011;148:449-451.
- 🌐 Howard WW, Rosenbuch RF y Lauerman LLH. *Mycoplasmosis in animals: Laboratory Diagnosis.* Ed. Iowa State University Press / AMES. 1994. 173 pp.
- 🌐 Jang SS, Biberstein EL y Hirsh DC. *A diagnostic manual of veterinary clinical bacteriology and mycology.* Ed. University of California, Davis (USA). 1988. 171 pp.
- 🌐 Jores J, Beutner G, Hirth-Schmidt I, Borchers K, Pitt TL y Lübke-Becker A. Isolation of *Serratia marcescens* from an equine abortion in Germany. *Vet Rec.* 2004;154:242-244.
- 🌐 Katila T. Uterine defence mechanisms in the mare. *Anim Reprod Sci.* 1996;42:197-204.
- 🌐 Khurana SK y Malik P. Status of *Mycoplasma equigenitalium* among indigenous equines. *The Indian Journal of Veterinary Research.* 2009;18:17-19. Online ISSN: 0971-0171.
- 🌐 Kirchhoff H, Naglic T y Heitmann J. Isolation of *Acholeplasma laidlawii* and *Mycoplasma equigenitalium* from stallion semen. *Vet Microbiol.* 1979;4:177-179.
- 🌐 Kirchhoff H. *Mycoplasma equigenitalium*, a new species from the cervix region of mares. *Int J Syst Bacteriol.* 1978;28:496-502.
- 🌐 van Kuppeveld FJ, Johansson KE, Galama JM, Kissing J, Bölske G, van der Logt JT y Melchers WJ. Detection of *Mycoplasma* contamination in cell cultures by a *Mycoplasma* group-specific PCR. *Appl Environ Microbiol.* 1994;60:149-152.
- 🌐 van Kuppeveld FJ, van der Logt JT, Angulo AF, van Zoest MJ, Quint WG, Niesters HG, Galama JM y Melchers WJ. Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Appl Environ Microbiol.* 1992;58:2606-2615.
- 🌐 LeBlanc MM y Causey RC. Clinical and subclinical endometritis in the mare: both threats to fertility. *Reprod Domest Anim.* 2009;44 Suppl 3:10-22.
- 🌐 LeBlanc MM. Advances in the diagnosis and treatment of chronic infectious and post-mating-induced endometritis in the mare. *Reprod Domest Anim.* 2010;45 Suppl 2:21-27.
- 🌐 LeBlanc MM, Giguère S, Lester GD, Brauer K y Paccamonti DL. Relationship between infection, inflammation and premature parturition in mares with experimentally induced placentitis. *Equine Vet J Suppl.* 2012 ;(41):8-14.

- 🌐 Lemcke RM, Ernø H y Gupta U. The relationship of two equine mycoplasmas to *Mycoplasma mycoides*. J Hyg (Lond). 1981;87:93-100.
- 🌐 López MM, Llop P, Olmos A, Marco-Noales E, Cambra M y Bertolini E. Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses?. Curr Issues Mol Biol. 2009;11:13-46.
- 🌐 Lu KG y Morresey PR. Infectious diseases in breeding stallions. Clin Tech Equine Pract. 2007;6:285-290.
- 🌐 Lucero NE, Ayala SM, Escobar GI y Jacob NR. *Brucella* isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. Epidemiol Infect. 2008 ;136:496-503.
- 🌐 Madill S. Reproductive considerations: mare and stallion. Vet Clin North Am Equine Pract. 2002;18:591-619.
- 🌐 Mailles A, Rautureau S, Le Horgne JM, Poignet-Leroux B, d'Arnoux C, Dennetière G, Faure M, Lavigne JP, Bru JP y Garin-Bastuji B. Re-emergence of brucellosis in cattle in France and risk for human health. Euro Surveill. 2012;17:1-3.
- 🌐 Mair TS y Divers TJ. Brucellosis in the horse. p. 275-289. Tomado en: <http://www.bellequine.co.uk/publications.php>, 25 de Febrero de 2013.
- 🌐 Mallardo K, Nizza S, Fiorito F, Pagnini U, De Martino L y Donnarumma G. A comparative evaluation of methicillin-resistant staphylococci isolated from harness racing-horses, breeding mares and riding-horses in Italy. Asian Pac J Trop Biomed. 2013;3:169-173.
- 🌐 Martínez Sosa Alain. Comparación de la respuesta inflamatoria endometrial en servicios intra e inter específicos en equinos y su relación con el desarrollo del cuerpo lúteo. Tesis de Licenciatura. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Tecamachalco, Puebla. 2011.
- 🌐 Mays CMB, LeBlanc MM y Paccamonti D. Route of fetal infection in a model of ascending placentitis. Theriogenology 2002;58:791-792.
- 🌐 McAuliffe L, Ellis RJ, Lawes JR, Ayling RD y Nicholas RA. 16S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis; a single generic test for detecting and differentiating *Mycoplasma* species. J Med Microbiol. 2005;54:731-739.

- 🌐 Megid J, Mathias LA y Robles CA. Clinical manifestations of Brucellosis in domestic animals and humans. The Open Veterinary Science Journal [electronic resource] 2010;4:119-126.
- 🌐 Metcalf ES. The role of international transport of equine semen on disease transmission. Anim Reprod Sci. 2001;68:229-237.
- 🌐 Moorthy AR y Spradbrow PB. The effect of mycoplasmas and acholeplasmas of equine origin on organ cultures of chicken-embryo trachea. J Comp Pathol. 1985;95:209-216.
- 🌐 Morel MC, Newcombe JR y Swindlehurst JC. The effect of age on multiple ovulation rates, multiple pregnancy rates and embryonic vesicle diameter in the mare. Theriogenology. 2005;63:2482-2493.
- 🌐 Morris S, Kelleman AA, Stawicki RJ, Hansen PJ, Sheerin PC, Sheerin BR, Paccamonti DL y LeBlanc MM. Transrectal ultrasonography and plasma progesterin profiles identifies fetoplacental compromise in mares with experimentally induced placentitis. Theriogenology. 2007;67:681-691.
- 🌐 Myers DM. Manual de métodos para el diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis. Organización Panamericana de la Salud (Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina regional de la Organización Mundial de la Salud), (Nota Técnica N 30), 1985. Pp. 46
- 🌐 Nakane D, Adan-Kubo J, Kenri T y Miyata M. Isolation and characterization of P1 adhesin, a leg protein of the gliding bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. J Bacteriol. 2011;193:715-722.
- 🌐 Nielsen JM. Endometritis in the mare: a diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy. Theriogenology. 2005;64:510-518.
- 🌐 Omer MK, Skjerve E, Holstad G, Woldehiwet Z y Macmillan AP. Prevalence of antibodies to *Brucella* spp., in cattle, sheep, goats, horses and camels in the State of Eritrea; influence of husbandry systems. Epidemiol Infect. 2000;125:447-453.
- 🌐 Ortega-Ferrusola C, González-Fernández L, Muriel A, Macías-García B, Rodríguez-Martínez H, Tapia JA, Alonso JM y Peña FJ. Does the microbial flora in the ejaculate affect the freezeability of stallion sperm? Reprod Domest Anim. 2009;44:518-522.
- 🌐 Overbeck W, Witte TS y Heuwieser W. Comparison of three diagnostic methods to identify subclinical endometritis in mares. Theriogenology. 2011;75:1311-1318.

- 🌐 Pavan ME, Brihuega B, Pettinari MJ y Cairó F. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of reference strains used for the diagnosis of leptospirosis in Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2011;43:251-255.
- 🌐 Pettersson B, Tully JG, Bölske G y Johansson KE. Re-evaluation of the classical *Mycoplasma lipophilum* cluster (Weisburg et al. 1989) and description of two new clusters in the hominis group based on 16S rDNA sequences. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001;51:633-643.
- 🌐 Pettersson B, Uhlén M y Johansson KE. Phylogeny of some mycoplasmas from ruminants based on 16S rRNA sequences and definition of a new cluster within the hominis group. *Int J Syst Bacteriol.* 1996;46:1093-1098.
- 🌐 Pilo P, Vilei EM, Peterhans E, Bonvin-Klotz L, Stoffel MH, Dobbelaere D y Frey J. A metabolic enzyme as a primary virulence factor of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony. *J Bacteriol.* 2005;187:6824-6831.
- 🌐 Pilo P, Frey J y Vilei EM. Molecular mechanisms of pathogenicity of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Vet J.* 2007;174:513-521.
- 🌐 Pinna AE, Martins G, Hamond C, Lilenbaum W y Medeiros MA. Molecular diagnostics of leptospirosis in horses is becoming increasingly important. *Vet Microbiol.* 2011;153:413.
- 🌐 Pozor M. Diagnostic applications of ultrasonography to stallion's reproductive tract. *Theriogenology.* 2005;64:505-509.
- 🌐 Razin S, Yogev D y Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998;62:1094-1156.
- 🌐 Refai M. Incidence and control of brucellosis in the Near East region. *Vet Microbiol.* 2002;90:81-110.
- 🌐 Riddle WT, LeBlanc MM y Stromberg AJ. Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a Thoroughbred practice. *Theriogenology.* 2007;68:395-402.
- 🌐 Rosendal S, Blackwell TE, Lumsden JH, Physick-Sheard PW, Viel L, Watson S y Woods P. Detection of antibodies to *Mycoplasma felis* in horses. *J Am Vet Med Assoc.* 1986;188:292-294.

- 🌐 Rosengarten R y Yogev D. Variant colony surface antigenic phenotypes within mycoplasma strain populations: implications for species identification and strain standardization. *J Clin Microbiol.* 1996;34:149-158.
- 🌐 Rottem S. Interaction of mycoplasmas with host cells. *Physiol Rev.* 2003;83:417-432.
- 🌐 Ruhnke HL y Rosendal S. Useful protocols for diagnosis of animal mycoplasmas. In *Mycoplasmosis in animals: laboratory diagnosis.* 1 ed. Iowa (USA): Iowa State University Press, 1994. Pp. 141-167.
- 🌐 Samper JC y Tibary A. Disease transmission in horses. *Theriogenology.* 2006;66:551-559.
- 🌐 SAGARPA2010:
<http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Publicaciones/Lists/Programa%20Nacional%20Pecu%20ario/Attachments/1/PNP260907.pdf>
- 🌐 Sambrook J y Rusell DW. Protocol 1. Purification of RNA from cells and tissues by acid phenol-guanidinium thiocyanate-chloroform extraction. *Molecular Cloning a laboratory manual.* 3er ed. Ed. Cold Spring Harbor, New York. 2001. Pp: 613-617.
- 🌐 Sheoran AS, Nally JE, Donahue JM, Smith BJ y Timoney JF. Antibody isotypes in sera of equine fetuses aborted due to *Leptospira interrogans* serovar pomona-type kennewicki infection. *Vet Immunol Immunopathol.* 2000;77:301-309.
- 🌐 Sieme H, Katila T y Klug E. Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallions. *Theriogenology.* 2004;61:769-784.
- 🌐 Snider TA, Sepoy C y Holyoak GR. Equine endometrial biopsy reviewed: observation, interpretation, and application of histopathologic data. *Theriogenology.* 2011;75:1567-1581.
- 🌐 Spergser J, Aurich C, Aurich JE y Rosengarten R. High prevalence of mycoplasmas in the genital tract of asymptomatic stallions in Austria. *Vet Microbiol.* 2002;87:119-129.
- 🌐 Svenstrup HF, Jensen JS, Gevaert K, Birkelund S y Christiansen G. Identification and characterization of immunogenic proteins of mycoplasma genitalium. *Clin Vaccine Immunol.* 2006;13:913-922.
- 🌐 Tazumi A, Maeda Y, Buckley T, Millar B, Goldsmith C, Dooley J, Elborn J, Matsuda M y Moore J. Molecular epidemiology of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from horses in Ireland. *Ir Vet J.* 2009;62:456-459.

- 🌐 Tiago G, Júlio C y António R. Conception rate, uterine infection and embryo quality after artificial insemination and natural breeding with a stallion carrier of *Pseudomonas aeruginosa*: a case report. *Acta Vet Scand.* 2012;54:20.
- 🌐 Timoney JF, Kalimuthusamy N, Velineni S, Donahue JM, Artiushin SC y Fettinger M. A unique genotype of *Leptospira interrogans* serovar Pomona type kennewicki is associated with equine abortion. *Vet Microbiol.* 2011;150:349-353.
- 🌐 Tortschanoff M, Aurich C, Rosengarten R y Spersger J. Phase and size variable surface-exposed proteins in equine genital mycoplasmas. *Vet Microbiol.* 2005;110:301-306.
- 🌐 Troedsson MH. Breeding-induced endometritis in mares. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2006;22:705-712.
- 🌐 Troedsson MH. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. *Theriogenology.* 1999;52:461-471.
- 🌐 Tully JG y Razin S. Cloning and filtration techniques for *Mycoplasma*. En: *Methods in mycoplasmaology.* (USA): Academic Press. 1983. Pp: 173–177.
- 🌐 Vanasco NB, Sequeira G, Dalla Fontana ML, Fusco S, Sequeira MD y Enría D. Descripción de un brote de leptospirosis en la ciudad de Santa Fe, Argentina, marzo-abril de 1998. *Rev Panam Salud Publica / Pan Am J Public Health.* 2000;7(1):35-40.
- 🌐 Whitford HW, Rosenbusch RF y Lauerman LH. *Mycoplasmosis in Animals: Laboratory Diagnosis.* 1 ed. Iowa (USA): Iowa State University Press, 1994. 173 pp.
- 🌐 Whithear KL y Browning GF. Capítulo 29. *Mycoplasma.* *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals.* 3rd ed. Ed. Wiley. 2008. Pp. 397-414.
- 🌐 Willi B, Boretti FS, Baumgartner C, Tasker S, Wenger B, Cattori V, Meli ML, Reusch CE, Lutz H y Hofmann-Lehmann R. Prevalence, risk factor analysis, and follow-up of infections caused by three feline hemoplasma species in cats in Switzerland. *J Clin Microbiol.* 2006;44:961-969.
- 🌐 Zgórnjak-Nowosielska I, Bielanski W y Kosiniak K. Mycoplasmas in stallion semen. *Anim Reprod Sci.* 1984;7:343-350.
- 🌐 Zhang Q y Wise KS. Localized reversible frameshift mutation in an adhesin gene confers a phase-variable adherence phenotype in mycoplasma. *Mol Microbiol.* 1997;25:859-869.