

Detección de microorganismos de la clase *Mollicutes* asociados al complejo respiratorio-reproductivo en caballos de Mayabeque, Cuba



Detection of microorganisms of the class *Mollicutes* associated to the respiratory-reproductive complex in horses from Mayabeque, Cuba

<http://opn.to/a/ipUqz>

Ania Ramón-Martínez ¹, Fulgencio Pupo-Batista ², Lisset Roblejo-Arias ¹, Adrian Díaz Sánchez ¹, Ileana Miranda-Cabrera ¹, Belkis Corona González ¹, Evelyn Lobo-Rivero ¹

¹Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, CP 32 700, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

²Universidad Agraria de La Habana (UNAH) "Fructuoso Rodríguez Pérez", Carretera Tapaste y Autopista Nacional, Km 23 ½, CP 32 700, San José de Las Lajas, Mayabeque, Cuba.

RESUMEN: Las investigaciones sobre la detección de micoplasmas en caballos son relativamente escasas; sin embargo, existen reportes sobre su asociación al complejo respiratorio-reproductivo. En Cuba se desconoce sobre la presencia de estos microorganismos en caballos, por lo que el objetivo de este trabajo fue detectar la presencia de microorganismos de la clase *Mollicutes* asociados al complejo respiratorio-reproductivo en caballos procedentes de San José de las Lajas, Mayabeque. Para esto se trabajaron 97 animales procedentes de cuatro localidades de este municipio. Se colectaron 131 exudados (97 nasales y 34 prepuciales) para el diagnóstico por cultivo microbiológico y PCR. En 37,11 % de las muestras se detectó la presencia de *Mollicutes*; de ellas 88,8 % correspondieron a exudados nasales y 11,2 % a exudados prepuciales. En todas las localidades se detectó la presencia de *Mollicutes*; la localidad "D" y los animales mayores de dos años fueron los de mayor número de resultados positivos. Se obtuvo un aislado procedente de exudado prepucial, el cual se identificó por pruebas bioquímicas, como *Acholeplasma* spp. Por primera vez en Cuba se realizan estudios relacionados con la presencia de *Mollicutes* en caballos, por lo que resulta necesario continuar los estudios relacionados con la epidemiología de estos patógenos, como parte del control del complejo respiratorio-reproductivo en esta especie.

Palabras clave: *Acholeplasma*, diagnóstico, equino, *Mollicutes*, *Mycoplasma*.

ABSTRACT: Researches on the detection of mycoplasmas in horses are relatively scarce. However, there are reports about their association to the respiratory-reproductive complex. In Cuba, the presence of these microorganisms in horses is unknown, so the objective of this work was to detect the presence of microorganisms of the class *Mollicutes* associated to the respiratory-reproductive complex in horses from Mayabeque, Cuba complex in horses from San José de las Lajas, Mayabeque. For this purpose, 97 animals from four localities of this municipality were analyzed. One hundred and thirty-one exudates (97 nasal and 34 preputial) were collected for diagnosis by microbiological culture and PCR. The presence of *Mollicutes* was detected in 37.11 % of the samples; of these 88.8 % corresponded to nasal exudates and 11.2 % to preputial exudates. The presence of *Mollicutes* was detected in all localities. Locality "D" and animals older than two years old had the highest number of positive results. An isolate was obtained from preputial exudate, which was identified as *Acholeplasma* spp. by biochemical tests. Studies related to the presence of *Mollicutes* in horses are being carried out for the first time in Cuba, so it is necessary to continue studies related to the epidemiology of these pathogens, as part of the control of the respiratory-reproductive complex in this species.

Key words: *Acholeplasma*, diagnosis, equine, *Mollicutes*, *Mycoplasma*.

*Autor para correspondencia: Evelyn Lobo Rivero. E-mail: elobo@censa.edu.cu

Recibido: 17/06/2019

Aceptado: 14/11/2019

INTRODUCCIÓN

Los micoplasmas carecen de pared celular o precursores químicos del péptidoglucano, presentan formas pleomórficas con requerimientos nutricionales exigentes y tienen un genoma que puede ir de las 580 a 1,800 kpb (1). Las colonias de los micoplasmas muestran un centro denso debido al crecimiento dentro del agar y crecimiento poco denso en las zonas periféricas (2), por lo que da la apariencia de “huevo frito”. Estos microorganismos pertenecen a la clase *Mollicutes*, donde los géneros *Mycoplasma* y *Acholeplasma* se encuentran infectando a animales y a humanos (3). La familia *Mycoplasmataceae* requiere de colesterol para su crecimiento, mientras que la familia *Acholeplasmatales* puede crecer en medios libres de esteroides (4). Muchas de estas micoplasmosis se presentan como enfermedades crónicas con una alta morbilidad y una baja mortalidad, y el periodo de presentación de los síntomas puede ser desde una semana hasta meses (5).

En el diagnóstico de los micoplasmas pueden utilizarse diferentes ensayos que incluyen el cultivo microbiológico, las pruebas bioquímicas, serológicas y los ensayos de ácidos nucleicos (6). Estas bacterias tienen la particularidad de requerir condiciones exigentes para su crecimiento; por lo general, su cultivo demora varias semanas, por lo que se dificulta la realización de algunas pruebas bioquímicas (7). Por otra parte, algunas pruebas serológicas son inespecíficas y pueden producir reacciones falsas positivas (8). Sin embargo, la técnica de PCR resulta altamente específica, sensible y rápida, por tal motivo se utiliza ampliamente en la detección de micoplasmas (6).

El caballo es una de las especies que representa un mayor riesgo de introducción y diseminación de entidades, debido al aumento en el intercambio comercial que se efectúa a través de ferias expositivas, la introducción de semen para aumento de indicadores de reproducción, así como la importación de animales de alto valor genético. Entre las entidades que afectan al caballo cobran especial interés aquellas relacionadas con trastornos respiratorios y reproductivos (9).

Internacionalmente se reportan alrededor de 18 especies de micoplasmas que pueden estar presentes asociados a procesos invasivos del tracto respiratorio y genitourinario (10,11). Algunos de estos microorganismos están relacionados con enfermedades respiratorias contagiosas en caballos que provocan enfermedad inflamatoria de las vías respiratorias (11) y síndrome de dificultad respiratoria (12). En animales con problemas reproductivos, se detecta *Mycoplasma equigenitalium*, *Mycoplasma subdolum* y *Acholeplasma* spp. (13), y se conoce que *M. equigenitalium* se asocia con infertilidad, endometritis, vulvitis y abortos en yeguas; reducción de la fertilidad y balanopostitis en los sementales (14).

En Cuba se desconoce el estatus infeccioso de estos microorganismos en caballos, por lo que el objetivo de este trabajo fue detectar la presencia de microorganismos de la clase *Mollicutes* asociados al complejo respiratorio-reproductivo en caballos procedentes de San José de las Lajas, Mayabeque.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de los animales y área de estudio

Las localidades seleccionadas para el muestreo se visitaron una única vez durante el periodo de septiembre de 2014 a agosto de 2015; se realizó un muestreo de tipo aleatorio simple a caballos (*Equus caballus*) ubicados en cuatro localidades que pertenecen a San José de las Lajas, provincia Mayabeque. De cada animal se registraron los datos referentes a edad y sexo (Tabla 1). No se revelan los nombres de las localidades para respetar el acuerdo de confidencialidad firmado por las autoridades implicadas.

Tipo de muestra

De cada animal se colectó un exudado nasal y en el caso de los machos, adicionalmente, exudado prepucial, excepto en la localidad “C” por no contar con las condiciones de manejo del animal. Las muestras se trasladaron en 1ml de medio de transporte (5 g de agar triptonsoya en 125 mL de agua desionizada y 1 mL de albúmina bovina (5 %).

Posteriormente se retiraron los isopos y de cada muestra se utilizaron 400 µL para el cultivo microbiológico y 500 µL de cada muestra para la extracción de ADN. El resto de la muestra se conservó a -20°C.

Cultivo microbiológico para micoplasmas

Las muestras se subcultivaron en medio Hayflick Agar (placas) y Hayflick Caldo (tubos) e incubadas en condiciones de aerobiosis (tubos) y microaerofilia (placas) según el procedimiento descrito por Poveda (15), para favorecer el crecimiento de los micoplasmas. La lectura e interpretación se realizó cada 24 horas para la muestra subcultivada en medio líquido (tubos), para la observación de cambios en el pH y/o la turbidez y cada 48 horas para la muestra subcultivada en medio sólido (placas), según lo describe Poveda (15). En todos los casos se utilizaron controles negativos y positivos.

Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de aislados fueron fermentación de la glucosa, hidrólisis de la arginina (16), producción de “film y spot” (17), reducción del

tetrazolium y prueba de requerimiento de colesterol o digitonina (15).

Extracción de ADN por choque térmico

El procedimiento utilizado fue el reportado por Fernández y Chávez (18). El producto de la extracción se conservó a -20°C hasta su posterior utilización. Se utilizaron 3 µL de la muestra procesada para la PCR. Durante el proceso de extracción se usaron controles positivos y negativos.

Cebadores

En la [Tabla 2](#) se muestran los cebadores empleados para la detección de microorganismos de la clase *Mollicutes* y de *Acholeplasma laidlawii*. Cada pareja de cebadores amplifica una región correspondiente al ARNr 16S.

Mezcla de la reacción y programa de la PCR

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 25 µL, conteniendo 1X GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, EE.UU.), 0.8 µM de cada cebador y 3 µL de ADN de la muestra. Para los controles positivos

Tabla 1. Procedencia y características de las muestras. / *Origin and characteristics of the samples.*

Localidad	A	B	C	D	Totales
Animales totales	43	20	15	19	97
Exudados totales	60	28	15	28	131
Hembras	26	8	8	8	50
Machos	17	12	7	11	47
Menores de 2 años	17	4	4	9	34
Mayores de 2 años	26	16	11	10	63
Exudados nasales	43	20	15	19	97
Exudados prepuciales	17	8	0	9	34

Tabla 2. Cebadores utilizados para la amplificación del ARN de microorganismos de la clase *Mollicutes* y de *A. laidlawii*. / *Primers used for RNA amplification of microorganisms of the class Mollicutes and A. laidlawii.*

Nombre	Secuencia nucleotídica	Talla del amplicón (pb)	Referencias
<i>Mollicutes</i>	5'-GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT-3'	270	(19,20)
	5'-TGCACCATCTGTCACTCTGTAAACCTC-3'		
<i>A. laidlawii</i>	5'-GATGAGAACTAAGTGTGGCCATAA-3'	300	(21)
	5'-CGCTAGAGTCCCCAACTTAATGA-3'		

M. arginini y *A. laidlawii* se aplicaron 2 µL de ADN y como control negativo de utilizaron agua libre de nucleasas, agua destilada estéril y PBS. Las reacciones se desarrollaron en un termociclador Eppendorf Mastercycler gradient 96 (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania).

El programa de amplificación para microorganismos de la clase *Mollicutes* fue: 94°C durante 4 min, 35 ciclos de 94°C durante 1 min, 60°C durante 1 min y 72°C durante 2 min; seguido de una extensión final a 72°C durante 8 min (19, 20). Las condiciones para realizar la PCR para *A. laidlawii* fueron: 94°C durante 3 min, 32 ciclos de 94°C durante 1 min, 60°C durante 30 seg y 72°C durante 1 min y una extensión final a 72°C durante 5 min (21).

Visualización de los resultados

Los productos amplificados se aplicaron en geles de agarosa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, EE.UU.) al 2% en tampón TBE 0,5X y se corrieron a 100 V y 50 mA en una cámara de electroforesis Maxiphor 2012 (LKB, Bromma, Suecia), durante 35 minutos en tampón de corrida TBE 0,5X. Los geles se tiñeron con Bromuro de Etidio (0,5 µg/mL) durante 15 minutos y los resultados se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta Macro Vue (Pharmacia Biotech Inc., EE.UU.). En todos los casos se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Promega, Madison, EE.UU.).

Análisis Estadístico

Los datos se agruparon en una base de datos en Microsoft Excel 2010. Se realizó una comparación múltiple de proporciones entre cada localidad, según los resultados positivos a microorganismos de la clase *Mollicutes* por PCR y su relación con las variables sexo (hembras/machos) y edad (menores de 2 años/mayores de 2 años). Se empleó el programa estadístico CompaProWin_2.0.1 (22).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La utilización de la PCR permitió detectar la presencia de microorganismos de la clase *Mollicutes* en 36/97 caballos (37,11 %). De estos, el 88,8 % (32/36) correspondió a muestras de

exudados nasales. También Carman *et al.* (23) reportaron una alta prevalencia de micoplasmas en las vías respiratorias de caballos, pues encontraron 33 % de positividad en sus muestras.

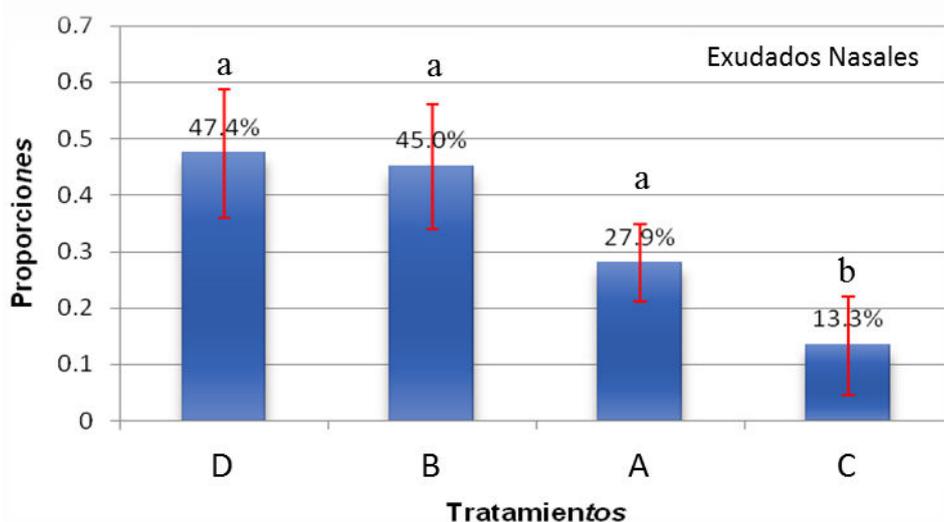
Antal *et al.* (24) describieron que, en vías respiratorias altas, los micoplasmas pueden encontrarse como comensales, aunque también se les detecta en coinfección con otras bacterias ocasionando trastornos respiratorios. En tal sentido, Mete y Özgür (11) reportaron *Mycoplasma equirhinis* y *Mycoplasma felis* asociados a procesos respiratorios y a pleuritis en caballos.

Se desconocen aspectos relacionados con la patogenicidad de los micoplasmas; sin embargo, se describe que estos agentes, bajo presiones epidemiológicas, pueden revertir su condición de comensales a patógenos (25). Los mecanismos de patogenicidad se atribuyen, en parte, a la competencia con las células del hospedero por substratos metabólicos precursores de lípidos, purinas y pirimidinas; así como a su habilidad para adherirse e invadir a las células del hospedero, a la variación de su fenotipo (variación de fase/variación antigénica/variación de talla), probablemente para evadir la respuesta inmune del hospedero (evasión inmune), y a sus efectos citopáticos (26).

Los animales portadores asintomáticos tienen un papel importante en la diseminación de estos agentes, según lo refiere Dieckmann *et al.* (27). Estos animales pueden ser responsables de la persistencia desapercibida de la infección, desempeñan un papel importante en el mantenimiento y la epidemiología de los micoplasmas en las localidades estudiadas, sin la manifestación clínica de la enfermedad. Por lo que se hace necesario continuar con el estudio de identificación de las especies de micoplasmas, así como su posible asociación con otras bacterias, aspecto que no fue tratado en esta investigación.

La Figura 1 muestra la proporción de animales positivos a micoplasmas, a partir de los exudados nasales, en las diferentes localidades. En todas las localidades se detectó la presencia de microorganismos de la clase *Mollicutes*, lo que evidencia la amplia distribución de estos agentes en los caballos estudiados.

Teniendo en cuenta el número de animales



Leyenda: localidades A, B, C, y D./ Legend: localities A, B, C, and D.

Figura 1. Distribución de animales positivos a microorganismos de la clase *Mollicutes* (a partir de exudados nasales) en las diferentes localidades que forman parte de este estudio./ *Distribution of positive animals to microorganisms of the class Mollicutes (from nasal exudates) in the different localities that are part of this study.*

positivos, su distribución en todas las localidades estudiadas, la posibilidad de los micoplasmas de revertir su condición de comensales a patógenos, así como la presencia de posibles animales portadores, se hace necesario ampliar los estudios epidemiológicos relativos a la presencia de micoplasmas hemotrópicos, otras bacterias y hemoparásitos en la población estudiada, lo cual puede provocar un estado de salud desfavorable en los caballos muestreados.

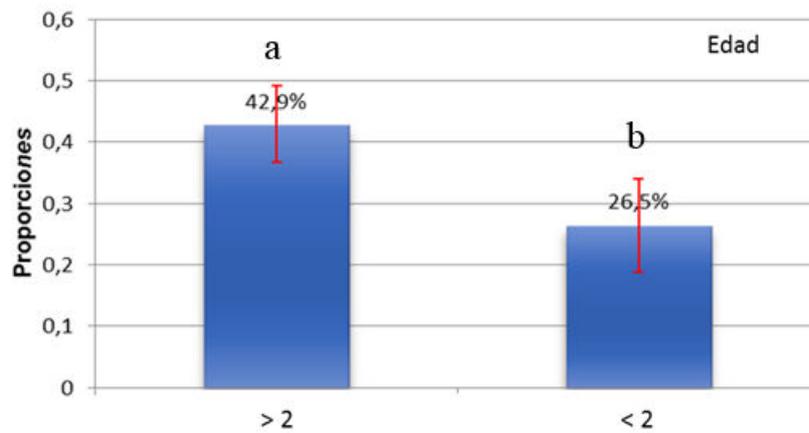
Se detectó la presencia de microorganismos de la clase *Mollicutes* en 8/34 (23,5 %) exudados prepucciales, mediante la PCR. Este porcentaje difiere del reportado por Baczynska *et al.* (28), quienes señalan que en un muestreo realizado a 80 caballos (machos), en Dinamarca, no encontraron muestras positivas a micoplasmas. Por el contrario, reportes realizados por Spersger *et al.* (10) refieren una positividad de 80 % a micoplasmas. La variación en estos porcentajes puede estar influenciada por varios factores, como son el tipo de muestra, la población estudiada, la presencia de otros agentes, entre otros.

El resultado de la PCR, para la detección de microorganismos de la clase *Mollicutes*, a partir de muestras clínicas de exudados prepucciales, evidenció que del total de muestras positivas, el mayor número se detectó en la localidad “D”

(4/9 animales), seguida por “B” y “A”, que tuvieron similar comportamiento entre ellos 2/8 animales y 2/17 animales.

El hecho de que los micoplasmas genitales se transmiten a través del semen, según lo señala Baczynska *et al.* (28) es un elemento importante a tener en cuenta, ya que en poblaciones equinas donde no se realiza una inseminación artificial y de igual manera no se controla la calidad microbiológica del semen existe un mayor riesgo de diseminar una infección por estos microorganismos. En el equino, *M. equigenitalium* y *M. subdolum* son las especies que se transmiten a través de semen, tienen implicaciones tanto en desórdenes reproductivos como genitales y su prevalencia se reporta de forma variable en diferentes regiones geográficas (10). Por tanto, identificar las especies detectadas en el presente trabajo debe ser un punto de partida en futuras investigaciones, debido a las implicaciones que tienen estos microorganismos para la salud.

La relación entre la presencia de estos agentes y la edad (Figura 2) muestra que la mayor cantidad de caballos positivos se encuentran en el grupo de animales mayores de 2 años, existiendo diferencias estadísticamente significativas en comparación con los encontrados en el grupo menor de 2 años. Estos resultados coinciden con



Leyenda: > 2: caballos mayores de 2 años, < 2: caballos menores de 2 años. Legend: > 2: horses over 2 years old, < 2: horses under 2 years old.

Figura 2. Proporción de caballos positivos a microorganismos de la clase *Mollicutes* según la edad./ *Proportion of positive horses to microorganisms of the class Mollicutes according to age*

lo planteado por Spergser *et al.* (10), quienes obtuvieron una mayor frecuencia de infección, por micoplasmas, en animales mayores, reportando valores entre 59 y 66 % de positividad.

Una posible explicación a los resultados obtenidos en este trabajo, se debe al progresivo contacto de los animales a una fuente de infección, como es el caso de animales portadores asintomáticos (27). Por otra parte, con la edad aumenta la frecuencia de monta, esto unido al no control sanitario de los animales puede aumentar la frecuencia de aparición de estos agentes.

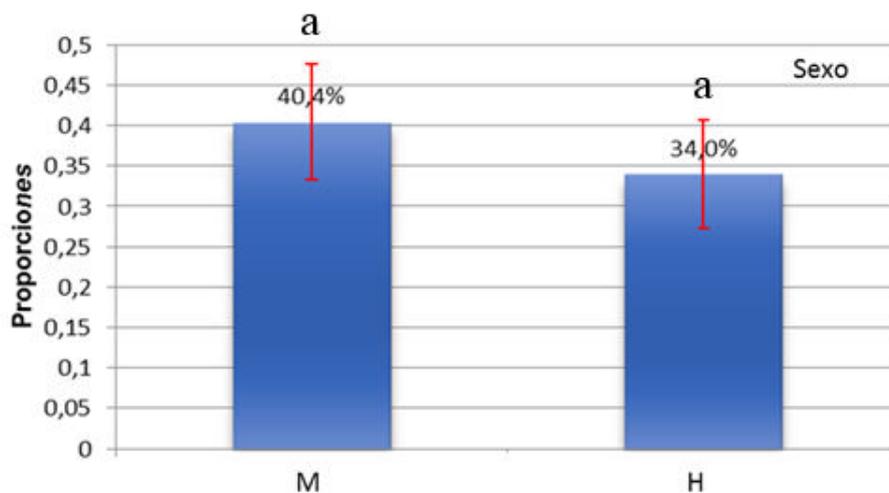
La Figura 3 muestra la relación entre la presencia de estos agentes y el sexo. A pesar de no haber diferencias significativas, existe un mayor porcentaje de positividad en machos (40,4 %) en comparación con las yeguas (34,0 %). Resultados similares a los obtenidos en el presente trabajo son reportados por varios autores, en diferentes especies de animales, donde se refiere que los machos son más propensos a adquirir la infección por micoplasmas debido al modo de vida, conducta, peleas durante el celo, entre otros aspectos (14,29).

Cuando se compararon las diferentes localidades donde se realizó el estudio se evidenció que la localidad "D" es la de mayor número de animales positivos (Figura 4). Este

comportamiento también es señalado por Spergser *et al.* (10), quienes reportan diferencias entre las zonas geográficas estudiadas. Estos autores señalan a las condiciones del clima y el manejo en la población equina como las posibles causas que incidieron en la presencia de micoplasmas. En este estudio, el resultado pudo estar influenciado por un problema de manejo de esta especie animal y no por condiciones del clima, ya que las cuatro localidades se encuentran ubicadas en una zona con similares condiciones climatológicas.

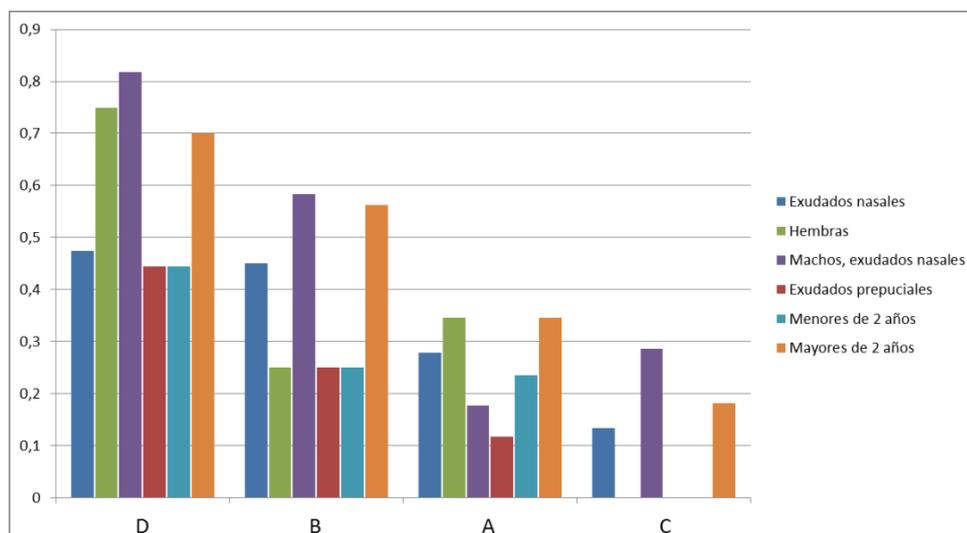
De los 131 exudados colectados, solamente se logró un aislamiento, el mismo correspondió a una muestra procedente de exudado prepucial del muestreo realizado en la localidad "A" (Figura 5). Los resultados obtenidos difieren con los reportados por Baczynska *et al.* (28), pues no lograron aislamientos de micoplasmas después de muestrear 80 caballos en Dinamarca. De igual manera difieren de los reportados por Spergser *et al.* (10), que reportan 29 % de aislamiento cuando muestrearon 438 caballos en Austria. Es importante señalar que el aislamiento de micoplasmas puede estar condicionado por varios factores, como el tipo de muestra y la contaminación con otras bacterias.

Los micoplasmas mantienen una estrecha relación con el hospedero, donde sus propiedades biológicas tienden a reflejar afinidad por la especie animal y/o tejidos, lo que implica



Leyenda: M: Machos, H: Hembras. / Legend: M: Males, H: Females.

Figura 3. Proporción de animales positivos a microorganismos de la clase *Mollicutes* según el sexo. / Proportion of positive animals to microorganisms of the class *Mollicutes* according to sex.



Leyenda: localidades A, B, C, y D. / Legend: localities A, B, C, and D.

Figura 4. Comportamiento de las diferentes variables en los escenarios estudiados. / Behavior of the different variables in the studied scenarios.

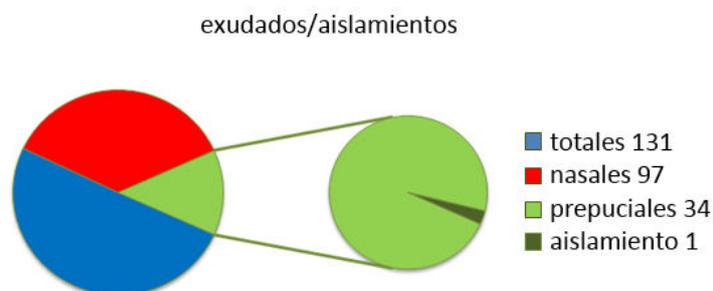


Figura 5. Relación entre exudados y aislamiento de micoplasmas. / Relationship between exudates and isolation of mycoplasmas.

especificidades nutricionales muy selectivas (30). En el caso de los micoplasmas que afectan el tracto genitourinario de los equinos, aunque se les puede aislar de prepucio, tienden a colonizar la corona del glande del pene y la uretra, por lo que se recomienda estos sitios como ideales para la colecta de muestra (10). Este aspecto pudo haber influenciado negativamente en el porcentaje de positividad reportado en el presente trabajo, ya que solo se trabajó con muestras colectadas de prepucio.

Dada la fragilidad fisiológica de los micoplasmas, junto a su alto requerimiento nutricional, hacen que los métodos bacteriológicos requieran de atenciones y procedimientos especiales para que la contaminación bacteriana no dificulte su crecimiento (15). En el presente trabajo, 51,09 % de las muestras fueron eliminadas por contaminación bacteriana, lo cual disminuyó la probabilidad de éxito del aislamiento.

La morfología de los micoplasmas puede variar en dependencia de la especie, de los constituyentes del medio de cultivo y de la fase de crecimiento del cultivo (31). La Figura 6 muestra el crecimiento en forma de “huevo frito” del aislamiento. Como se puede apreciar, la colonia presenta un centro oscuro embebido en el agar rodeado por una capa fina y traslúcida sobre el agar, lo cual coincide con lo descrito por Poveda (15), como característico para micoplasmas.

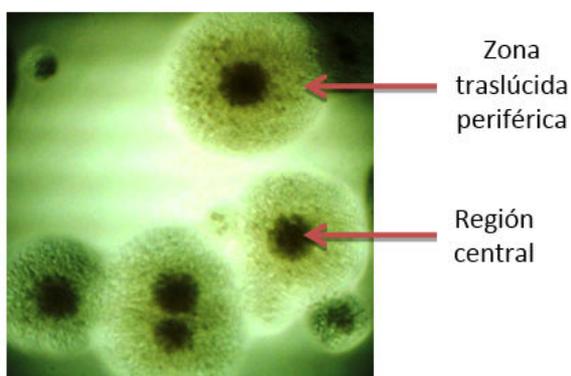


Figura 6. Crecimiento en la muestra procedente de exudado prepucial. En la misma se observa la típica colonia de “huevo frito”. / Growth in sample from preputial exudate. The typical “fried egg” colony can be observed.

La Tabla 3 muestra el comportamiento del aislado frente a las diferentes pruebas bioquímicas. El aislado fermentó la glucosa y no metabolizó la arginina, provocando en el medio de cultivo líquido una disminución de pH; se observó un cambio de coloración de rojo (normal del medio) a naranja. Este resultado coincide con lo descrito como característico para *Acholeplasma* spp. según Brown (32).

La producción de *film* y *spot* es una propiedad que presentan pocos micoplasmas (15). En algunas especies, como *Mycoplasma agalactiae*, *Mycoplasma bovis* y *Mycoplasma gallinarum*, es característica esta propiedad, mientras que otros como *Mycoplasma hyoneumoniae* y *Mycoplasma flocculare* muestran una débil reacción; por el contrario, algunas especies como *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma arginini* y el género *Acholeplasma* no muestran reacción alguna. Este comportamiento fue observado en el aislado, quien resultó negativo a esta prueba.

En la prueba de reducción de tetrazolium, la reacción fue negativa al no observarse la coloración rosa en las colonias del aislado. Este resultado coincide con lo descrito por Brown (32) para el género *Acholeplasma*.

La prueba de la digitonina es un método bioquímico que permite determinar si el microorganismo necesita esteroides o no para su crecimiento. De esta manera se puede distinguir entre la familia *Mycoplasmataceae* (no crecimiento frente a la digitonina) y la familia *Acholeplasmataceae* (crecimiento frente a la digitonina) (15). Esta diferenciación es posible debido a que la digitonina presente en el disco desprende el colesterol de la membrana celular de los micoplasmas, mientras que los acholeplasmataceae contienen mayoritariamente fosfolípidos en su membrana celular y muestran resistencia hacia la digitonina (33).

La prueba de la digitonina resultó negativa para el aislado, pues hubo crecimiento alrededor del disco. Por tanto, el aislado en cuestión se considera dentro de la familia *Acholeplasmataceae*. Esto concuerda con lo reportado por Kirchhoff *et al.* (34), quienes observaron la presencia de *Acholeplasma laidlawii* en semen de sementales aparentemente saludables.

Tabla 3. Características bioquímicas de la especie aislada. / *Biochemical characteristics of the isolated species.*

Comportamiento frente a diferentes pruebas bioquímicas					
Aislado	Digitonina	F/glucosa	H/arginina	R/tetrazolium	Film y spots
	-	+	-	-	-

Leyenda: F: fermentación; H: hidrólisis; R: reducción. / *Legend: F: fermentation; H: hydrolysis; R: reduction.*

Entre las especies de acholeplasmas que pueden estar presentes en el equino se encuentra *Acholeplasma laidlawii* (10). Con el objetivo de conocer si el aislado correspondía a esta especie se le realizó la PCR especie específica. El resultado fue negativo, pues no se observó la amplificación de una banda de 300 pb correspondiente con el control positivo utilizado en el ensayo. Existen otras especies de acholeplasmas que pueden estar presentes en el equino; en tal sentido se deben continuar los trabajos de identificación de este aislado utilizando otros ensayos de ácidos nucleicos que incluyan la secuenciación.

Los resultados del presente trabajo son los primeros estudios que se realizan en Cuba, relacionados sobre la presencia de microorganismos de la clase *Mollicutes* en esta especie animal. Por tanto, al tener como base estos resultados se hace necesario identificar las especies de micoplasmas presentes en las muestras positivas a microorganismos de la clase *Mollicutes*. Es importante continuar el estudio de estos microorganismos como parte del control del complejo respiratorio-reproductivo, de manera tal que se pueda encausar adecuadamente su diagnóstico, las medidas de control y la percepción del riesgo de estos microorganismos.

En el presente estudio se detectó la presencia de microorganismos de la clase *Mollicutes* en caballos procedentes de la provincia Mayabeque; la localidad "D" fue la de mayor número de animales positivos. No se encontró asociación con el sexo y la presencia de microorganismos de la clase *Mollicutes*; sin embargo, el mayor número de muestras positivas se encontró en caballos mayores de dos años, aspecto a tener en cuenta en futuras medidas de control. Se identificó *Acholeplasma* spp. en una muestra procedente de exudado prepucial del muestreo realizado en la localidad "A". Este resultado

constituye el primer reporte de la presencia de estos agentes en Cuba.

REFERENCIAS

1. Cordova C, Hoeltgebaum DL, Machado L, Dos Santos L. Molecular biology of mycoplasmas: from the minimum cell concept to the artificial cell. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences.* 2016;599-607.
2. Nocard R. The microbe of pleuropneumonia. 1896. *Rev Infect Dis.* 1990;12(2):354-358.
3. Johansson KE, Pettersson B. Taxonomy of Mollicutes. In: Razin R, editor. *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas.* USA: Springer.2008. p. 29.
4. Champoux J, Neidhardt F, Drew LD, Plorde JJ. Sherris Medical Microbiology: An Introduction To Infectious Diseases. 4TH ed. Ray KJRyCG, editor. 2004. 409-13 p.
5. Bradbury J. Micoplsamas aviares: situación epidemiológica actual, bioseguridad y diagnóstico. 2007:6.
6. Fernández-Molina C, Rodríguez-Preval N, Rodríguez-González I, Agnese-Latino M, Rivera-Tapia JA, Ayala-Rodríguez I. Diagnóstico de *Mycoplasma genitalium* por amplificación de los genes MgPa y ARN ribosomal 16S. *Salud Pública de México.* 2008;50(5):358-61.
7. Razin S, Hayflick L. Highlights of mycoplasma research - An historical perspective. *Biologicals.* 2010;38(2):183-190.
8. Manual de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). 2015.
9. Informe semestral de la Dirección de Sanidad Animal, MINAG. 2017.
10. Spargser J, Aurich C, Aurich JE, Rosengarten R. High prevalence of mycoplasmas in the genital tract of asymptomatic stallions in Austria. *Vet Microbiol.* 2002;87(2):119-129.

11. Mete A, Özgür NY. Investigation of the presence of *Mycoplasma* as an etiologic agent of inflammatory airway diseases in thoroughbred racehorses in Istanbul Province. *Turk J Vet Anim Sci.* 2017;41:365-371.
12. Malik P, Chahota R, Bhardwaj B, Gupta S, Sharma M. A Study on the Prevalence of *Mycoplasma* spp. in the Upper Respiratory Tract of Healthy and Diseased Equines in Himachal Pradesh. 2016; p. 31.
13. Losinno L, Córdoba ML, Fumuso E. Infecciones de transmisión sexual (ITS) en equinos. 2016;1-32.
14. Nehra K, Rana R, Viswas KN, Arun TR, Singh VP, Singh AP, *et al.* Isolation and molecular identification of *Mycoplasma equigenitalium* from equine genital tracts in northern India. *Iran J Vet Res.* 2015;16(2):176-181.
15. Poveda JB. Biochemical Characteristic in *Mycoplasma* identification. In: Miles RJ, Nicholas RA, editors. *Methods in Molecular Biology.* Totowa, New Jersey, U.S.A: Humana Press. Inc.; 2010; p. 69-79.
16. Razin S, Tully J, Rose D, Barile M. DNA cleavage patterns as indicators of genotypic heterogeneity among strains of *Acholeplasma* and *Mycoplasma* species. *J Gen Microbiol.* 1983;129(6):1935-1944.
17. Freundt E. Culture media for classic mycoplasmas. *Methods in mycoplasmaology.* 1983;1:127-35.
18. Fernández C, Chávez Y. Aplicación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para la detección de micoplasmas en cultivos celulares. *Rev Salud Anim.* 1999;18(1):31-34.
19. van Kuppeveld FJ, Johansson KE, Galama JM, Kissing J, Bolske G, van der Logt JT, *et al.* Detection of mycoplasma contamination in cell cultures by a mycoplasma group-specific PCR. *Applied Environmental Microbiol.* 1994;60(1):149-152.
20. European Pharmacopoeia 8.0, section 2.6.7. *Mycoplasmas.* 2014.
21. Molla KV, Shokrgozar MA, Arabestani MR, Moghadam MS, Azari S, Maleki S, *et al.* PCR-based detection and eradication of mycoplasmal infections from various mammalian cell lines: a local experience. *Cytotechnology.* 2009;61(3):117-124.
22. Castillo YIM. COMPAPROP: Sistema para comparación de proporciones múltiples. *Rev Protección Veg.* 2014;29(3):231-234.
23. Carman S, Rosendal S, Huber L, Gyles C, McKee S, Willoughby RA, *et al.* Infectious agents in acute respiratory disease in horses in Ontario. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* 1997;9(1):17-23.
24. Antal T, Szabo I, Antal V, Vajda G, Polner A, Totth B, *et al.* Respiratory disease of horses associated with *Mycoplasma* infection. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B J Vet Med, Series B.* 1988;35(4):264-270.
25. Hasselbring BM, Sheppard ES, Krause DC. P65 Truncation Impacts P30 Dynamics during *Mycoplasma pneumoniae* Gliding. *J Bacteriol.* 2012;194(11):3000-3007.
26. Pilo P, Vilei EM, Peterhans E, Bonvin-Klotz L, Stoffel MH, Dobbelaere D, *et al.* A metabolic enzyme as a primary virulence factor of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony. *J Bacteriol.* 2005;187(19):6824-6831.
27. Dieckmann SM, Winkler M, Groebel K, Dieckmann MP, Hofmann-Lehmann R, Hoelzle K, *et al.* Haemotrophic *Mycoplasma* infection in horses. *Vet Microbiol.* 2010;145(3-4):351-353.
28. Baczynska A, Fedder J, Schougaard H, Christiansen G. Prevalence of mycoplasmas in the semen and vaginal swabs of Danish stallions and mares. *Vet Microbiol.* 2007;121(1-2):138-143.
29. Pereyra NB, Pérez AM, Messick JB, Cane FD, Guglielmone AA. Estudio de factores de riesgo asociados a la infección por *Mycoplasma suis*. *InVet.* 2010;12(2):121-130.
30. Waites KB, Katz B, Schelonka RL. *Mycoplasmas* and ureaplasmas as neonatal pathogens. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(4):757-789.
31. Volokhov DV, Graham LJ, Brorson KA, Chizhikov VE. *Mycoplasma* testing of cell substrates and biologics: Review of alternative non-microbiological techniques. *Mol Cell Probes.* 2011;25(2-3):69-77.

32. Brown DR. Phylum XVI. Tenericutes. In: De Vos P, G. Garrity, D. Jones, N.R. Krieg, W. Ludwig, F.A. Rainey, K.H. Schleifer y W.B. Whitman, editor. Bergey's Manual(r) of Systematic Bacteriology: Volume Four The *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Tenericutes* (*Mollicutes*), *Acidobacteria*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Dictyoglomi*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae*, and *Planctomycetes*: Springer-Verlag New York. 2010; p. 976.
33. Lobo E. Mollicutes de interés en Medicina Veterinaria. Monografías. 2004.
34. Kirchoff H, Naglic T, Heitmann J. Isolation of *Acholeplasma laidlawii* and *Mycoplasma equigenitalium* from stallion semen. *Vet Microbiol.* 1979;4:177-179.

Los autores de este trabajo declaran no presentar conflicto de intereses.

Los autores de este trabajo declaran presentar una participación igualitaria en la concepción, ejecución y escritura de la investigación.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)