

DETERMINACIÓN MOLECULAR DE AGENTES BACTERIANOS DIFÍCILES DE CULTIVAR EN SEMEN BOVINO CRIOPRESERVADO DE ORIGEN COMERCIAL



Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

Pergamino,.....

DETERMINACIÓN MOLECULAR DE AGENTES BACTERIANOS DIFÍCILES DE CULTIVAR EN SEMEN BOVINO CRIOPRESERVADO DE ORIGEN COMERCIAL

Trabajo Final de Grado

de la alumna

LUCILA BELÉN MORALES

Aprobada por el Tribunal Evaluador

(Nombre y Apellido)
Evaluador

(Nombre y Apellido)
Evaluador

(Nombre y Apellido)
Evaluador

Iglesias Juliana
Tutora

Manes Jorgelina
Co-Directora

Alustiza Fabrisio
Director

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Pergamino,

CONTENIDO

RESUMEN.....	5
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1. GANADERÍA BOVINA ARGENTINA	6
1.2. SEMEN BOVINO	7
1.2.1. FISIOLÓGÍA Y MORFOLOGÍA DE LOS ESPERMATOZOIDES	7
1.2.2. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL EN TOROS	10
1.2.3. MICROBIOLOGÍA DEL SEMEN BOVINO.....	12
1.3. ROL DE LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN Y LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN LA PRODUCCIÓN BOVINA.....	13
1.4. MICROORGANISMOS DIFÍCILES DE CULTIVAR ASOCIADOS CON AFECCIONES CLÍNICAS REPRODUCTIVAS EN EL GANADO BOVINO	15
1.4.1. <i>Mycoplasma spp.</i>	16
1.4.1.1. <i>Mycoplasma bovis</i>	19
1.4.1.2. <i>Mycoplasma californicum</i>	21
1.4.1.3. <i>Mycoplasma bovigenitalium</i>	21
1.4.2. <i>Chlamydia spp:</i>	22
1.4.3. <i>Ureaplasma spp:</i>	25
1.4.3.1. <i>Ureaplasma diversum</i>	25
1.5. ROL DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN LA DETECCIÓN DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS	28
2. HIPÓTESIS	30
3. OBJETIVOS	30
3.1. Objetivo General.....	30
3.2. Objetivos específicos.....	30
4. MATERIALES Y MÉTODOS	31

4.1. MUESTRA O POBLACIÓN	31
4.2. EVALUACIONES DE CALIDAD SEMINAL.....	31
4.3. EXTRACCIÓN DE ADN DE MUESTRAS DE SEMEN BOVINO CRIOPRESERVADO.....	32
4.4. DETECCIÓN MOLECULAR DE MICROORGANISMOS DIFÍCILES DE CULTIVAR MEDIANTE TÉCNICAS DE PCR.....	34
4.4.1. PCR convencional para identificar especies específicas de <i>Mycoplasma spp.</i>	35
4.4.2. PCR multiplex para identificar <i>Chlamydia spp.</i>	35
4.4.3. PCR nested para identificar <i>Ureaplasma diversum</i>	35
4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	36
5. RESULTADOS.....	38
5.1. Cuantificación de ADN obtenido de las muestras de semen criopreservado	38
5.1.1. Relación entre la concentración de ADN cuantificada y la presencia de microorganismos difíciles de cultivar.....	39
5.2. Prevalencia de microorganismos difíciles de cultivar en semen bovino criopreservado.....	39
5.3. Efecto de la presencia de los microorganismos evaluados sobre la calidad seminal en muestras de semen bovino criopreservado de origen comercial	42
8. DISCUSIÓN	45
9. CONCLUSIONES.....	47
10. ANEXO	49
11. BIBLIOGRAFÍA.....	50

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de genes de *Mycoplasma spp.*, *Chlamydia spp.* y *Ureaplasma spp.* en muestras de semen bovino criopreservado de origen comercial mediante la técnica molecular de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), y correlacionar la presencia de los mismos con ciertos parámetros de calidad seminal. Para ello se utilizaron 94 pajuelas de semen bovino criopreservadas de origen comercial, provenientes de 60 toros de 7 centros de reproducción. Las muestras almacenadas en nitrógeno líquido fueron descongeladas y se determinó la movilidad espermática total (MET) y movilidad rectilínea progresiva (MRP) en dos tiempos (T1: momento de descongelación y T2: 120 minutos post-descongelación). La integridad de la membrana plasmática (IMP) se evaluó usando tinción eosina y nigrosina. La funcionalidad de la membrana plasmática (FMP) del compartimiento flagelar se determinó mediante el test de endósmosis (Hos-Test). Se extrajo el ADN de cada pajuela para la detección molecular de los genes correspondientes a *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovisgenitalium*, *Mycoplasma californicum*, *Ureaplasma diversum* y *Chlamydia spp.* mediante el empleo de técnicas de PCR con *primers* específicos, utilizando un termociclador (BioRad). Al finalizar las reacciones de PCR, se realizó una corrida electroforética en geles de agarosa al 2%, y se empleó bromuro de etidio para observar los amplicones bajo un transiluminador UV-Visible. Se determinó la presencia de *Mycoplasma californicum* en 41% (38/94) de las muestras, de *Mycoplasma bovisgenitalium* en 22% (21/91), *Ureaplasma diversum* en 11% (11/94), *Chlamydia spp* 23S en el 47% (44/94) y *Chlamydia spp.* 16S en 7% (7/94). No se detectó la presencia de la secuencia génica de *Mycoplasma bovis*. Se observó una tendencia de que la presencia de genes de *U. diversum* afecta negativamente la movilidad espermática total y la movilidad rectilínea progresiva sin afectar los demás parámetros. La presencia de genes de *M. californicum*, *M. bovisgenitalium* y *Chlamydia spp.* (16S y 23S) en las pajuelas analizadas no afectó las variables de calidad seminal en ninguno de los tiempos evaluados. Se concluye que es posible detectar genes correspondientes a *Mycoplasma californicum*, *Mycoplasma bovisgenitalium*, *Ureaplasma diversum* y *Chlamydia spp.* (genes 23S y 16S) en semen bovino criopreservado de origen comercial, y que la presencia de *Ureaplasma diversum* podría ser capaz de afectar los parámetros de motilidad seminal en las muestras de semen criopreservado analizadas.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. GANADERÍA BOVINA ARGENTINA

En la República Argentina, la ganadería bovina representa una de las principales actividades económicas como fuente de producción de carne y leche (Rojas *et al.* 2018). El stock ganadero argentino registrado actualmente es de casi 53 millones de cabezas, dentro del cual casi 8 millones de cabezas corresponden a vacas y 350 mil a toros (SENASA, 2021). Si bien la producción bovina se practica en áreas de todo el país, se pueden diferenciar cinco grandes zonas agroecológicas ganaderas: Región Pampeana, Región del Noreste, Región del Noroeste, Región Semiárida y Región Patagónica. Cada una presenta una calidad de producción de pastos diferencial que por efecto genera una distribución regional característica de la actividad ganadera (Rearte, 2011).

La ganadería es un factor clave para el desarrollo sostenible en la agricultura. La demanda y la producción de productos ganaderos están aumentando rápidamente, debido al crecimiento de la población, el aumento de los ingresos y los cambios en el estilo de vida y las dietas (FAO, 2021). Uno de los principales factores que contribuyen a mejorar el retorno económico de una explotación ganadera es la optimización de la eficiencia reproductiva (Paolilli *et al.* 2019). La monta natural de cualquier animal doméstico es una práctica habitual para los productores, pero puede generar infecciones entre los animales, crías de bajo peso al nacer y muertes prematuras que provocan pérdidas económicas en los rodeos de nuestro país (FAO, 2021). La proporción de pérdidas reproductivas atribuidas a un agente específico varía según la región, la condición climática, el tipo de producción, las prácticas de manejo, los programas de vacunación y de control. Entre los agentes más frecuentemente asociados a abortos bovinos en la Argentina se encuentran virus (herpesvirus bovino y el virus de la diarrea viral bovina), bacterias (*Brucella abortus*, *Campylobacter fetus*, *Leptospira spp.*) y protozoos (*Tritrichomonas foetus* y *Neospora caninum*); sin embargo, el 50-60% de los abortos estudiados son de etiología indeterminada (Rojas *et al.* 2018). En este sentido, las nuevas biotecnologías reproductivas actuales como, la congelación del semen del ganado bovino y su uso en inseminación artificial, ofrecen al productor un medio rápido y eficaz para alcanzar los niveles de producción de leche y carne deseados, al aumentar el número de partos de una vaca donante utilizando semen congelado de los mejores sementales vacunos (CONABIA, 2021). Según estadísticas mundiales, más del 95% de las inseminaciones en bovinos se realizan con semen

congelado (Thibier y Wagner, 2002). Debido a la gran expansión que ha tenido la utilización de semen criopreservado a nivel mundial, aumenta la necesidad de criterios estrictos para garantizar la bioseguridad de las dosis. Además, muchos microorganismos han logrado sobrevivir a los procesos de industrialización del semen e incluso han desarrollado una amplia resistencia a los antibióticos que se incluyen en los medios (Piasecka-Serafin, 1972). Sumado al hecho que Argentina, con veinticuatro millones de vientres en producción y frente a una demanda creciente de los mercados externos, tiene la oportunidad y el desafío de desarrollar una ganadería moderna y altamente tecnificada que permita agregar más valor y generar más empleos y divisas (Paolilli *et al.* 2019).

1.2. SEMEN BOVINO

El semen bovino se describe como una suspensión celular líquida que contiene los gametos masculinos (espermatozoides) y las secreciones de los órganos accesorios sexuales del aparato reproductor masculino, que constituyen el plasma seminal, los cuales se mezclan en el momento de la eyaculación. El plasma seminal tiene tres funciones esenciales: actúa como vehículo para los espermatozoides durante el momento de la eyaculación; sirve de activador a los espermatozoides previamente no móviles, y proporciona un medio rico en nutrientes que mantiene la supervivencia de los espermatozoides después de depositarse en el aparato genital de la hembra (Carpio-Chuchuca, 2015).

1.2.1. FISIOLÓGÍA Y MORFOLOGÍA DE LOS ESPERMATOZOIDES

Los espermatozoides, son las células germinales masculinas que se producen en el testículo (gónada masculina) mediante un proceso denominado espermatogénesis, donde adquieren características anatómicas y metabólicas particulares según la especie (Lozano, 2009).

Los testículos se caracterizan por ser glándulas con doble función, endócrina y gametogénica. Son los órganos productores de los espermatozoides y de hormonas sexuales, testosterona y pequeñas cantidades estrógenos. Están recubiertos por una capa fina de piel, el escroto, que cumple una función de protección (Figura 1). Por debajo del mismo, se encuentra la túnica dartos, equivalente del tejido subcutáneo, que está constituido por fibras musculares que reaccionan a los cambios de temperatura ascendiendo el testículo dentro de la cavidad escrotal ante bajas temperaturas y

descendiendo cuando las temperaturas superan las necesarias para la adecuada síntesis espermática. En la parte externa de los testículos se ubica la túnica albugínea, que cubre los túbulos seminíferos conectados a una red testicular que desemboca en el segmento inicial de la cabeza del epidídimo. El conducto del epidídimo se divide en tres zonas: cabeza, cuerpo y cola; y su importancia radica en que es el lugar en el cual los espermatozoides maduran (Berndston y Desjardins, 1974; Aponte *et al.* 2005).

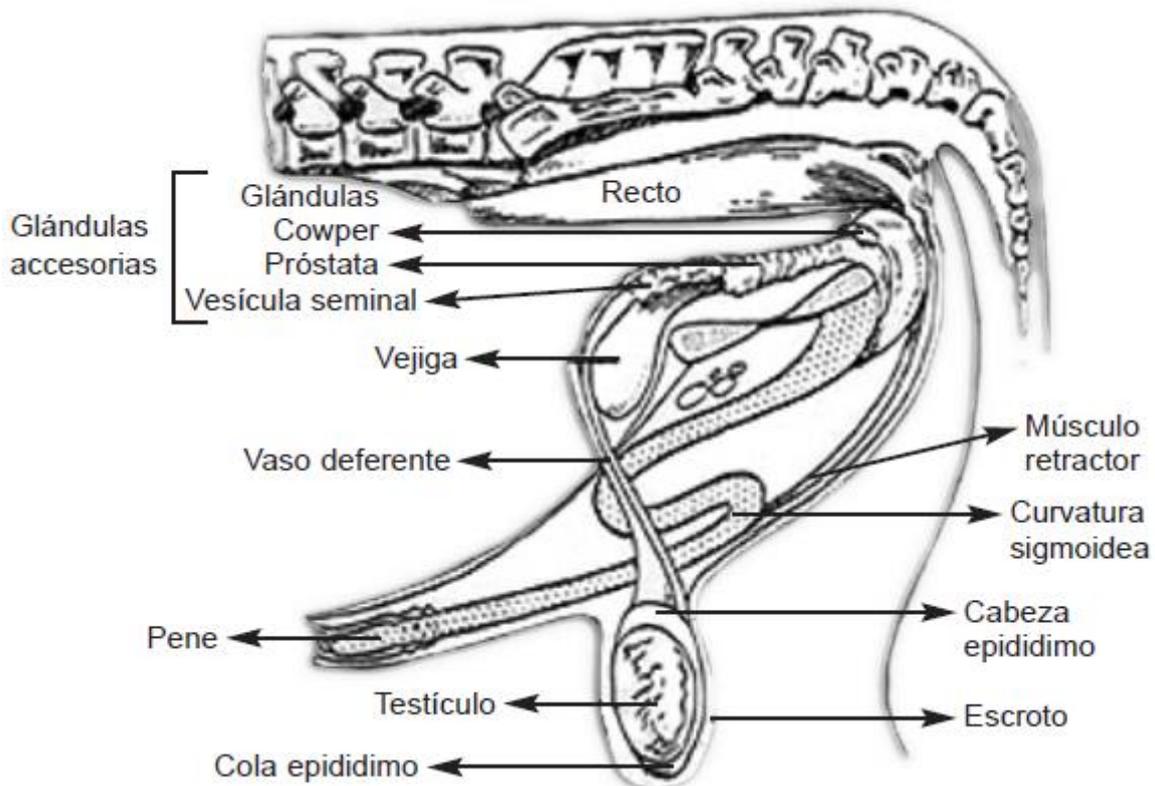


Figura 1: Esquema del aparato reproductor del toro. Fuente: Ordoñez *et al.* (2005).

En el estroma testicular, a nivel de los túbulos seminíferos, se lleva a cabo la espermatogénesis, que inicia con la pubertad del toro y consiste en un conjunto de eventos que comienza con la división de células fetales germinales para la producción de espermatogonias, con base en un control de tipo endocrino, paracrino y autocrino. El lumen de los túbulos seminíferos se establece aproximadamente entre los 5 y 8 meses de edad del ternero producto de la producción de un pico de la hormona folículo estimulante (FSH) que da lugar a una elevada proliferación de células de Sertoli, elongación de los túbulos seminíferos, al igual que incremento en el diámetro de los mismos. Cuando la mayoría de

estas células diferenciadas aparecen por primera vez en el lumen del túbulo seminífero, el animal alcanza la pubertad (Lozano, 2009).

En el proceso de espermatogénesis, a partir de cada espermatogonia se producen cuatro espermatocitos haploides que permanecen unidos entre sí por puentes citoplasmáticos y a la vez están en comunicación con la célula nutricia o de Sertoli. Estas últimas, a partir de moléculas señalizadoras inducen el proceso denominado espermiogénesis o metamorfosis que convierte las espermátides en espermatozoides. Se reconocen cuatro fases características en esta transformación: fase de Golgi, fase de encasquetamiento, fase acrosomal y la fase de maduración (Berndston y Desjardins, 1974; Aponte *et al.* 2005). Al finalizar, los espermatozoides son células alargadas, casi desprovistas de citoplasma, cubierta en su totalidad por la membrana plasmática (Figura 2). Están dotadas de una cabeza aplanada portadora de un gran núcleo compuesto por cromosomas altamente condensados; el extremo anterior del núcleo espermático está cubierto por el acrosoma que les permite interactuar y penetrar el ovocito secundario para dar lugar a la fecundación. Además, presentan una cola provista por un flagelo que les otorga movilidad, gracias a una serie de mitocondrias ubicadas en la región anterior que producen adenosín trifosfato (ATP), la fuente de energía necesaria para mantener su motilidad ya que tienen poca actividad biosintética y dependen en gran medida de su función catabólica para mantener su vida. También están provistos de un pequeño retículo endoplásmico y aparato de Golgi que contribuyen a mantener la integridad de su membrana. Un cuello une la cabeza del espermatozoide con la cola flagelada (Barbas y Mascarenhas, 2009).

Para adquirir su capacidad fecundante, los espermatozoides sufren tres procesos fisiológicos: maduración epididimaria, capacitación y reacción acrosomal. La maduración del espermatozoide se produce con el tránsito de los espermatozoides a través del epidídimo hacia el conducto deferente. Durante la misma, las células sufren modificaciones físicas y químicas en la membrana plasmática, que incluye cambios en su composición lipídica y proteica y en los componentes estructurales (Datta *et al.* 2014).

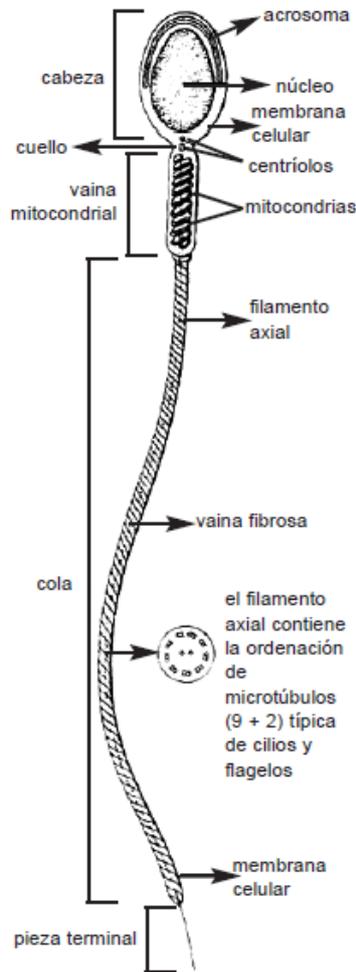


Figura 2: Morfología espermática. Fuente: Ordoñez *et al.* (2005).

1.2.2. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL EN TOROS

El conocimiento de la fertilidad o de la capacidad fecundante de cada toro es uno de los principales objetivos en la producción de semen bovino (Ordoñez *et al.* 2005). Post-descongelación del semen utilizado para la producción de pajuelas, mediante su evaluación se pretende conocer si ese eyaculado fue capaz de superar el proceso de congelación-descongelación. Los factores que pueden afectar las determinaciones de calidad seminal corresponden a factores intrínsecos del semen o factores de manejo del mismo (como la falta de nitrógeno líquido en el termo de almacenamiento) (Catena *et al.* 1999).

Las cualidades que deben tener los espermatozoides de un eyaculado fecundante son: motilidad progresiva, morfología normal, metabolismo energético activo, capacidad para desarrollar una motilidad hiperactivada, integridad estructural y funcionalidad de la

membrana, integridad de las enzimas asociadas con la fecundación, capacidad de penetración y transferencia óptima del material genético (Ordoñez *et al.* 2005). Sin embargo, en la evaluación de semen congelado se tienen en cuenta al menos tres parámetros básicos: viabilidad post-descongelación, morfología y número de espermatozoides con motilidad progresiva por dosis inseminante, determinados inmediatamente después de descongelado el semen y luego de 2 horas de incubación. Los cuales, a su vez pueden correlacionarse con la fertilidad y calidad del eyaculado (Catena *et al.* 1999).

La motilidad es uno de los parámetros más importantes del análisis seminal ya que ofrece una descripción general de la movilidad espermática. Consiste en evaluar el porcentaje de espermatozoides móviles, así como el tipo de movimiento que presentaba la media de una población espermática. La exactitud y precisión del análisis está limitada por las condiciones del sistema de medida y por la destreza del observador (Ordoñez *et al.* 2005).

La falta de integridad de la membrana plasmática está asociada con la pérdida de viabilidad celular, pero una membrana plasmática intacta no siempre indica que la célula sea viable. El procesado del semen, incluida su criopreservación afecta primeramente a sus membranas, modificando su organización, permeabilidad y composición lipídica. Las membranas espermáticas que pueden verse afectadas por la criopreservación incluyen la membrana plasmática, la membrana externa del acrosoma y las membranas mitocondriales. El análisis de la integridad de la membrana constituye una información importante en la evaluación de la fertilidad del macho, ya que esta integridad no sólo es fundamental para el metabolismo espermático sino también lo es para una adecuada capacitación y reacción acrosómica. Entre las pruebas desarrolladas, se destaca el test de endósmosis que consiste en someter a los espermatozoides a un medio de presión osmótica más baja que la fisiológica, lo que causa una entrada de agua en la célula en un intento de equilibrar la presión osmótica interna con la del medio externo. Esto último, provoca hinchamiento y enrollamiento del flagelo. Para que esta respuesta se produzca, la membrana plasmática del espermatozoide debe estar funcional y con los mecanismos de intercambio de fluidos trabajando correctamente; por lo contrario, las células con la membrana funcionalmente dañada no experimentan dichos cambios (Ordoñez *et al.* 2005; Catena *et al.* 1999).

El análisis morfológico de los espermatozoides es otra de las evaluaciones importantes que permite conocer las características de una muestra seminal, ya que su análisis se relaciona directamente con la proporción de espermatozoides anormales en el eyaculado, el tipo de defecto morfológico y su relación con la fertilidad *in vivo* de los toros. La coloración de eosina-nigrosina es ideal para evaluar la morfología espermática (Ordoñez *et al.* 2005; Catena *et al.* 1999).

Para cada una de estas evaluaciones, un conteo de 100 células es satisfactorio cuando no existen problemas mayores. Cuando un gran número de defectos espermáticos está presente, hasta 500 células deben ser contadas para obtener un espermograma preciso. Se exige un 70% de células normales. La sumatoria de la información que cada una de ellas (interpretada correctamente) brinda por separado, permite efectuar una predicción de la fertilidad potencial de un determinado semen (Catena *et al.* 1999).

1.2.3. MICROBIOLOGÍA DEL SEMEN BOVINO

En la biota saprofítica del prepucio de toros donantes sanos habitan especies bacterianas que, bajo las condiciones ambientales adecuadas, pueden comportarse como patógenos oportunistas. En consecuencia, estos microorganismos oportunistas aprovechan las condiciones del medio para sobrevivir, por lo que es prácticamente imposible la obtención de semen estéril (Wierzbowski, 1981; Puerta Suárez *et al.* 2015). Las bacterias contaminantes del semen pueden ser clasificadas como patógenas, potencialmente patógenas o no patógenas (Patel *et al.* 2012). Dependiendo del tipo de bacterias, una proporción de espermatozoides-bacterias (unidades formadoras de colonias [UFC]) de aproximadamente 1:1 hasta 100:1 en una muestra, es suficiente para generar efectos no deseados en las dosis de semen y condicionar su fertilidad (Auroux *et al.* 1991). Algunas bacterias pueden alterar la calidad espermática afectando su estructura, reduciendo la motilidad, o provocando una reacción prematura del acrosoma; incluso contaminar y afectar el tracto reproductivo de la hembra (Bolarín-Guillén, 2011). Por lo que su presencia, podría representar un riesgo significativo desencadenando procesos de infertilidad o infecciones en el tracto reproductivo de la hembra (Wierzbowski, 1981; Puerta Suárez *et al.* 2015).

Las exigencias sanitarias vigentes establecen que los toros donantes de semen deben estar libres de entidades infecciosas específicas como brucelosis, leptospirosis, campilobacteriosis, rinotraqueitis infecciosa bovina, diarrea viral bovina, tuberculosis y

leucosis infecciosa bovina, conocidas por ser transmisibles a través del semen. La Organización Mundial de Sanidad Animal afirma que ciertos microorganismos saprófitos (OIE, 1996), que no son detectados en las pruebas de diagnóstico de rutina durante la cuarentena de los reproductores donantes, son capaces de contaminar el semen de los toros sanos (Catena y Cabodevila 1995; Thoen *et al.* 1977). Por lo que se podría inferir que el semen bovino representa un potencial factor en la transmisión y difusión de agentes microbianos, y su identificación podría permitir dilucidar si tienen la capacidad de ocasionar enfermedades de alto impacto en la producción animal (Hare 1985; Hutchinson 1996).

Además de las posibles contaminaciones microbianas de origen animal como las descritas anteriormente, existen fuentes de contaminación microbiana no animal, que están relacionados con la utilización de materiales no esterilizados, equipos, malas condiciones higiénicas, y/o la contaminación humana (Althouse y Lu, 2005). La contaminación bacteriana del semen puede ocurrir en cualquier momento durante la producción de las dosis de inseminación, pero la principal fuente de contaminación se vincula a la colecta (Eaglesome *et al.* 1997). A pesar de que en la práctica se han adoptado varios procedimientos para minimizar la presencia de contaminantes en el semen (fundamentados básicamente en la higiene y desinfección rigurosa de los toros antes de la recolección), han sido poco eficaces, haciendo necesaria la adición de antibióticos en los diluyentes para la conservación del semen. Sin embargo, diferentes estudios han demostrado que más del 90% de las bacterias aisladas de semen diluido son resistentes a los antibióticos utilizados (Londra *et al.* 2021). Debido a que el proceso de criopreservación ha fracasado en controlar el crecimiento bacteriano después de la descongelación, en el comercio mundial de semen congelado de toros aumenta la necesidad de criterios estrictos para garantizar la bioseguridad del semen criopreservado (Bolarín-Guillén, 2011)

1.3.ROL DE LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN Y LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN LA PRODUCCIÓN BOVINA

La implementación de biotecnologías reproductivas, como la criopreservación de semen y la inseminación artificial (IA), permitió difundir germoplasma a nivel mundial (Ferré *et al.* 2020) y aumentar la eficiencia reproductiva de los animales destinados a la producción de leche, lana, pelo y carne, con el fin de aprovechar el potencial biológico de especies o razas genéticamente valoradas a un ritmo mucho más rápido. En el bovino, generalmente se

obtienen buenas tasas de fertilidad con dosis que contienen aproximadamente 20 millones de espermatozoides, permitiendo desarrollar programas de reproducción y selección que contribuyen a aumentar la producción de esta especie doméstica (Rodríguez *et al.* 2011; Palma, 2008; Córdova-Izquierdo *et al.* 2011).

Los primeros antecedentes de criopreservación espermática remontan al siglo XVII, consiste en un proceso secuencial de reducción de temperatura, deshidratación de la célula, congelación, almacenamiento y descongelación (Rasit Ugur *et al.* 2019; Hermes *et al.* 2019). Permite la conservación de semen por tiempos prolongados mediante la detención de los procesos biológicos que sufren los espermatozoides desde la eyaculación hasta la fecundación (Williams, 2013). Por otro lado, la IA fue practicada por primera vez en el siglo XII y hasta la actualidad su metodología no sufrió cambios significativos. Consiste en el depósito directo del semen en el útero de las vaquillonas, impidiendo que ocurra el efecto bactericida de la secreción cervicovaginal producida durante el estro (Thibier, 1990). Un requisito indispensable para el desarrollo de la inseminación artificial es que el semen utilizado mantenga su capacidad de fertilidad después de haber sido criopreservado, ya que un pequeño número de toros seleccionados es utilizado para inseminar una extensa población de hembras (Ordoñez *et al.* 2005). Sin embargo, son múltiples los posibles factores que pueden afectar la calidad del semen: por un lado, la criopreservación es capaz de afectar el número de espermatozoides viables porque los espermatozoides están sujetos a una serie de alteraciones en su estructura, tales como dilatación, rotura y cambios de permeabilidad a nivel de la membrana, dando como resultado una prematura capacitación espermática, lo que afectaría la vida media de los espermatozoides y su capacidad fertilizante (Lozano, 2009). Por otro lado, muchos patógenos y bacterias de la biota de la cavidad prepucial, como también los contaminantes de origen no animal, sobreviven a los procesos de industrialización tales como dilución, congelación y almacenamiento a -196°C en nitrógeno líquido siendo un riesgo para los animales, ya que algunos agentes son zoonóticos (Ronald y Prabhakar, 2001; Eaglesome y García, 1997). Los diluyentes utilizados para congelar semen, tienen la capacidad de proteger a los espermatozoides durante el descenso térmico y congelación, proporcionan los nutrientes necesarios para prolongar la viabilidad celular del espermatozoide *in vitro*, y contienen antibióticos para controlar la contaminación bacteriana (como penicilina y estreptomycin) que pueden contaminarse. Los componentes nutritivos utilizados en los diluyentes del semen favorecen el desarrollo y

la supervivencia de las bacterias resistentes a los antibióticos presentes en el diluyente, lo que trae como consecuencias el crecimiento microbiano, la acumulación de toxinas y productos del metabolismo bacteriano que generan un efecto espermicida directo (Pineda y Santander, 2007). Además, la problemática se incrementa con el desarrollo de resistencia a los antibióticos por parte de los microorganismos involucrados (Thibier y Guerin, 2000). Por otro lado, el nitrógeno líquido que se utiliza para el almacenamiento de semen podría actuar como una fuente insospechada de contaminación al convertirse en un criopreservante eficaz de patógenos (Marques *et al.* 2009; Mazurova y Krpatova, 1990).

Por todo esto, el uso combinado de la criopreservación con la IA no está exenta de riesgos y podría convertirse en una vía de diseminación de enfermedades infecciosas. Por ello, los Centros de IA deberían efectuar controles periódicos a los toros donantes de semen para que los mismos estén libres de enfermedades infecciosas.

1.4. MICROORGANISMOS DIFÍCILES DE CULTIVAR ASOCIADOS CON AFECIONES CLÍNICAS REPRODUCTIVAS EN EL GANADO BOVINO

Es importante considerar la multiplicidad de agentes involucrados en las infecciones reproductivas y la importancia de la vigilancia epidemiológica permanente (Campero *et al.* 2000). Las afecciones reproductivas comprenden desde abortos (muerte embrionaria y/o fetal) hasta la pérdida del ternero a los pocos días de vida. Se calcula que las enfermedades infecciosas reproductivas reducen alrededor del 10% la tasa anual de destete (Rojas *et al.* 2014; Rojas *et al.* 2018). A pesar de los esfuerzos realizados para prevenir la difusión de agentes patógenos en el ganado bovino, las infecciones desencadenadas por microorganismos bacterianos, virales o protozoarios son una significativa situación por resolver. Una correcta identificación del agente causal constituye una herramienta esencial que permitirá implementar medidas de control y prevención sanitarias adecuadas. A su vez, múltiples factores condicionan un correcto diagnóstico etiológico como por ejemplo: el tiempo transcurrido desde su hallazgo, el grado de contaminación, el tipo y el volumen del material enviado (Rojas *et al.* 2014).

Entre los agentes bacterianos contaminantes vinculados a trastornos clínicos en bovinos, se encuentran las especies que comprenden los géneros *Mycoplasma spp*, *Chlamydia spp* y *Ureaplasma spp* (Fish *et al.* 1985). Estos agentes no son evaluados de manera rutinaria en los exámenes convencionales que incluyen la calidad microbiológica del semen

(SENASA, 2008). Además, su difícil aislamiento e identificación genera que actualmente sea poco el conocimiento que hay de los mismos, principalmente en cuanto a su patogenicidad, su modo de actuar e invadir los diferentes órganos de los animales, y cuáles podrían ser los posibles nexos que colaborarían en su transmisión entre los bovinos.

1.4.1. *Mycoplasma spp.*

El género *Mycoplasma* pertenece al phylum *Tenericutes*, clase Mollicutes, familia Mycoplasmataceae, comprende alrededor de doscientas especies y está representado por catorce géneros ampliamente distribuidos en plantas, insectos, seres humanos y animales (Neres Santos Junior *et al.* 2021). Tienen un tamaño de genoma muy pequeño que varía entre los 0.58-1.4 millones de pares de bases (Mbp), en torno al mismo se los puede diferenciar en los géneros *Mycoplasma* y *Ureaplasma* que presentan entre 580-1,350 pares de kilobases (Kbp) y en los géneros *Acholeoplasma*, *Spiroplasma*, y *Anaeroplasma* que muestran entre 790-2,200 Kbp. Presentan un genoma reducido de ácido desoxirribonucleico doble cadena (ADNds) circular, con bajo contenido de G+C (23-40%). Al igual que en las bacterias, en los *Mycoplasmas* los genes de ARNr (16S-23S-5S) están separados por regiones espaciadoras de transcritos internos (ITS), cuya secuenciación y análisis de dichas regiones han permitido identificar una gran variabilidad interespecies entre la familia Mycoplasmataceae. De hecho, esta región se ha propuesto como marcador genético complementario para la identificación de las diferentes especies que comprenden al género *Mycoplasma* (Parker *et al.* 2018; Neres Santos Junior *et al.* 2021).

Son organismos de vida libre, autorreplicantes que se reproducen por fisión binaria y generan formas pleomórficas, filamentosas y multinucleadas que pueden ser observadas mediante microscopía electrónica. Carecen de pared celular de peptidoglicano, esto podría explicarse a que genes no esenciales se perdieron por reducción genómica y que estos microorganismos evolucionaron a partir de bacterias Gram-positivas por evolución degenerativa. Debido a esto, al utilizar la tinción de Gram se pueden observar en un microscopio óptico con una coloración roja. Tienen una membrana celular trilaminada con esteroides y una variedad de estructuras proteicas (como las proteínas de membrana asociadas a lípidos) que representan importantes factores de virulencia (Parker *et al.* 2018; Neres Santos Junior *et al.* 2021). En cuanto a su metabolismo, no presentan capacidad de fermentar glucosa ya que carecen de la vía de la arginina deshidrolasa para obtener

trifosfato de adenosina (ATP), sumado a que presentan el ciclo del ácido tricarboxílico incompleto y carecen de quinonas y citocromos. Además, no tienen la capacidad de fosforilación oxidativa efectiva como posible mecanismo generador de energía. En consecuencia, requieren suplementos adicionales para su crecimiento en condiciones de laboratorio, donde la absorción de nutrientes extracelulares y precursores biosintéticos (aminoácidos, nucleótidos y esteroides) son esenciales. Además, se observó en algunas especies de *Mycoplasmas* que su metabolismo depende de las condiciones del microambiente en el que se encuentran, lo que explicaría su capacidad de colonizar diferentes nichos y huéspedes, entre ellos rebaños de animales domésticos con gran interés agronómico (Neres Santos Junior *et al.* 2021).

En los animales tienen la capacidad de comportarse como comensales, saprófitos o patógenos. Generalmente colonizan las superficies de las mucosas respiratoria, urogenital, conjuntival, el tracto gastrointestinal y glándula mamaria, pudiendo generar mastitis, enfermedad respiratoria, otitis, artritis, trastornos reproductivos, meningitis y conjuntivitis. Incluso, algunas especies de *Mycoplasma* se han asociado con abortos consecuencia de infección de la placenta y del aparato respiratorio del feto. Además, pueden persistir como portadores sanos donde los *Mycoplasmas* pueden llevar un estilo de vida parasitario persistente. Todas estas manifestaciones clínicas pueden observarse al mismo tiempo en un rodeo afectado por *Mycoplasma* (Santos Junior *et al.* 2021; Calvinho y Neder, 2013). Presentan poca respuesta al tratamiento antibiótico debido en parte a que estos organismos carecen de pared celular y no son afectados por los antibióticos (beta lactámicos, penicilinas y derivados) con distintos mecanismos de acción, que son usados con frecuencia para tratar mastitis y otras afecciones. Entre las especies de *Mycoplasma* con mayor importancia agronómica en el ganado bovino se incluyen *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovigenitalium* y *Ureplasma diversum*. Su presencia se asocia con casos agudos de mastitis que no responden a los tratamientos usuales con antibióticos, siendo capaces de afectar más de un cuarto mamario y la calidad de la leche, la cual se observa descolorida, aguachenta, con color pardo y grumos. Existen reportes que describen la presencia de diversas especies de *Mycoplasma* en el tracto urogenital y respiratorio bovino, así como en fetos abortados (Calvinho y Neder, 2013; Neres Santos Junior *et al.* 2021).

Las especies del género *Mycoplasma* son capaces de generar infecciones en los órganos reproductivos del toro y pueden aislarse del semen en forma intermitente (Calvinho y Neder

2013). En estudios previos se aislaron especies de *Mycoplasmas* en la rete testis, epidídimo, conductos deferentes, próstata y glándulas bulbouretrales por lo que se cree que la biota prepucial es la mayor fuente de contaminación del semen (Fish *et al.* 1985). *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovis genitalium* y *Ureaplasma diversum* son patógenos poco estudiados en el tracto genital y podrían estar involucrados en alteraciones espermáticas como pérdida de movilidad como con *Mycoplasma bovis genitalium* (Jurmanova y Sterbova, 1977), vesiculitis, epididimitis causados por *Mycoplasma bovis* y *Mycoplasma bovis genitalium* respectivamente (Erno y Blom, 1972), endometritis causada por *Mycoplasma bovis* (Hartman *et al.* 1964), vulvovaginitis granular, infertilidad y abortos a causa de *Ureaplasma diversum* (Doig *et al.* 1981). Su naturaleza sumamente contagiosa, su escasa respuesta a tratamientos con antibióticos tornan necesario e importante su diagnóstico rápido y preciso, para el control y la prevención de brotes de las enfermedades que son capaces de generar. Hay evidencias que la IA con semen infectado con *Mycoplasma spp.* resultó en un diestro prolongado lo que sugirió que *Mycoplasma* es capaz de iniciar un proceso patológico en el útero de las vaquillonas (Parker *et al.* 2018; Pohjanvirta *et al.* 2020). En vacas adultas, se asocia su presencia a casos de vulvovaginitis con granulaciones o pápulas en la mucosa vaginal y con abortos consecuencia de infección de la placenta y del aparato respiratorio del feto. En terneros, son capaces de generar cuadros de artritis que pueden afectar desde una hasta varias articulaciones que generalmente se las puede observar hinchadas y con aumento de la temperatura, provocando que los animales afectados tengan dificultad para levantarse y caminar. Además, en terneros se observó que pueden colonizar la mucosa del pulmón y generar neumonía (en casos asociados con otras bacterias y virus). También se los asocia a casos de meningitis, observándose a los terneros echados, aletargados y renuentes a alimentarse, y en casos de otitis observándose la cabeza inclinada y orejas caídas y presencia de abscesos superficiales en la zona del pecho y los flancos, así como conjuntivitis (Calvinho y Neder 2013). Por lo mencionado anteriormente, puede decirse que *Mycoplasma* es capaz de afectar a todas las categorías de animales.

Tradicionalmente, la identificación y detección de especies del género *Mycoplasma* se realiza mediante cultivo microbiano debido a su simplicidad y bajo costo, pero esta metodología tiene varias limitaciones. Debido a la simplicidad estructural de estos organismos, el medio utilizado para cultivarlos debe ser estrictamente específico para

satisfacer su elevada demanda nutricional, como medios enriquecidos con infusión de corazón de res, suero, extracto de levadura, peptona y otros suplementos que requieren un buffer con un pH final de 7,3-7,8. Por otro lado, el aislamiento de *Mycoplasma* a través de los medios cultivo puede verse comprometido por el crecimiento excesivo de otras bacterias de crecimiento más rápido lo que hace que su identificación se vuelva muy difícil y hasta imposible, siendo necesario que se incorpore al medio antimicrobianos o antibióticos. Además, en sucesivos trabajos se han informado que el límite de detección de *Mycoplasmas* utilizando medios de cultivo es muy bajo, sumado a que presentan una tasa de crecimiento lenta, con colonias que no son visibles hasta un mínimo de 5 a 10 días, complicando la realización de un diagnóstico rápido. Por otro lado, las muestras deben almacenarse a 4°C y cultivarse lo antes posible para evitar posibles falsos negativos. Por último, en los medios de cultivo puede observarse el crecimiento de especies de *Acholeplasma*, que repetidamente se aíslan junto con las especies de *Mycoplasma*, haciendo muy difícil su diferenciación, ya que ambos presentan una morfología de colonia similar, con forma de "huevos fritos" (Parker *et al.* 2017).

Actualmente, el uso de metodologías moleculares como PCR, mediante la amplificación de secuencias génicas conservadas, permite suplir estas limitaciones para detectar diferentes especies de microorganismos, ya que a partir de varios tipos de muestras demostró proporcionar una mayor eficiencia, especificidad y sensibilidad para el diagnóstico de laboratorio en comparación con las metodologías de diagnóstico convencionales (Parker *et al.* 2018). Sin embargo, a pesar que se han desarrollado varias técnicas moleculares de PCR dirigidas para amplificar la región espaciadora de ARNr 16S-23S y permitir la identificación de especies de *Mycoplasma spp.* en investigaciones de brotes de enfermedades (Tang *et al.* 2000), actualmente en Argentina hay pocos reportes bibliográficos sobre la identificación de las diferentes especies de *Mycoplasmas* que pueden estar presentes en el semen bovino, su efecto sobre la calidad de los espermatozoides, su posible patogenia y alcance de infección entre bovinos. Por lo que, la generación de estos antecedentes podría permitir, frente a un brote de enfermedad causado por *Mycoplasma*, proporcionar un diagnóstico rápido mediante el empleo de técnicas de PCR para su detección, y podría facilitar la toma de decisiones oportunas respecto al ganado clínicamente afectado y mitigar el riesgo de transmisión entre bovinos.

1.4.1.1. *Mycoplasma bovis*

Mycoplasma bovis (*M. bovis*) se aisló por primera vez en Estados Unidos (América del Norte) en 1961, producto de un caso grave de mastitis en un rebaño lechero, que experimentó un brote que afectó a más del 30% de los animales (Gonzalez *et al.* 1992). En Argentina, se aislaron y tipificaron cepas de *Mycoplasma spp.* en el 2000 a partir de un brote clínico de mastitis en una granja lechera de la provincia de Buenos Aires (Cerdá *et al.* 2000). Es un importante patógeno bovino que produce un efecto debilitante sobre el bienestar animal que va acompañado de sustanciales pérdidas económicas para el sector productor. Se considera como el agente etiológico de mastitis, artritis, neumonías e infertilidad en ganado bovino. *M. bovis* es aislado frecuentemente en casos de mastitis bovina (Hotzel *et al.* 1993), y una vez establecido en un rebaño de ganado puede ser difícil de erradicar. Los esfuerzos para desarrollar vacunas eficaces no han tenido éxito hasta la actualidad (Pohjanvirta *et al.* 2020).

M. bovis también fue aislado en muestras de semen bovino comercial (Amram *et al.* 2013) y se observó que es capaz de causar alteraciones en la fecundación (Eaglesome y García, 1990) y generar alteraciones patológicas en los órganos reproductivos tras una infección intrauterina inducida experimentalmente (Hartman *et al.* 1964). Haapala y col. (2018) observaron que al inseminar vaquillonas con semen infectado con *M. bovis* solo la mitad de ellas fue capaz de concebir. En otro estudio realizado por Kissi y col. (1895), aislaron *M. bovis* de la mucosa cérvico-vaginal de vaquillonas inseminadas con semen infectado, de 8 a 32 semanas post-infección. Por otro lado, se realizaron diferentes tratamientos con antibióticos en semen fresco correspondiente a toros infectados con *M. bovis* pero solo se logró una reducción poco significativa en cuanto a la formación de colonias (Lozano, 2009). Sin embargo, aún es desconocida la concentración de *M. bovis* en la que puede encontrarse en el semen de un toro infectado naturalmente y cuál es la dosis infecciosa necesaria para generar afecciones en el tracto genital de la hembra. Por ello, es muy importante corroborar que el semen preseleccionado para ser utilizado en programas de IA esté libre de este agente infeccioso, ya que el riesgo de infección con *M. bovis* debido al comercio mundial de semen sigue siendo una preocupación (Pohjanvirta *et al.* 2020).

El desarrollo de metodologías de PCR para detectar *M. bovis* comenzó en la década de 1990 dirigidos contra la secuencia génica de ARNr 16S que contiene regiones altamente conservadas específicas de la especie. Sin embargo, actualmente se cuenta con pocos estudios aplicados a la detección de *M. bovis* en semen bovino utilizando esta herramienta.

1.4.1.2. *Mycoplasma californicum*

Mycoplasma californicum (*M. californicum*) se aisló y caracterizó por primera vez como una especie distinta de *Mycoplasma* en California en 1981, a partir de casos de mastitis severas que afectaban vacas lecheras lactantes y no lactantes (Jasper de Erno *et al.* 1981). En nuestro país, las primeras detecciones de *M. californicum* se efectuaron en muestras de leche provenientes de vacas lecheras afectadas con alguna sintomatología clínica previa. Actualmente, se cuentan con pocos antecedentes sobre su detección en tejidos o fluidos bovinos distintos de la glándula mamaria u leche (Sosa *et al.* 2018).

Los casos reportados de mastitis por *M. californicum* presentaban síntomas graves y una respuesta deficiente al tratamiento con antibióticos (Trautwein *et al.* 2002). Se logró cultivar a partir de muestras provenientes de útero, raspados vaginales, pulmones y articulaciones en vacas y terneros, por lo que podría comportarse como una bacteria autóctona en el ganado (Beer *et al.* 1986; Mackie *et al.* 1986). Estos hallazgos apoyan la teoría que *M. californicum* es capaz de cruzar las barreras mucosas, diseminarse sistémicamente a través del torrente sanguíneo y colonizar el tejido articular; y que además de ser un agente etiológico de mastitis puede en determinadas circunstancias volverse patógeno en otros tejidos. Sin embargo, aún no se ha informado casos donde una vaca infecta al feto o al ternero recién nacido por vía intrauterina o calostro, pero no se descarta como una posible fuente de infección (Trautwein *et al.* 2002; Rosengarten *et al.* 2001). Esto plantea el interrogante de cuáles son las posibles causalidades que contribuyen a la infección por este microorganismo en las vacas y los terneros afectados, y si una de esas posibles fuentes de contaminación puede ser el semen de los toros utilizados en los diferentes rebaños o cabañas.

1.4.1.3. *Mycoplasma bovis*

Mycoplasma bovis (*M. bovis*) junto con *M. bovis* comprende las especies de *Mycoplasma spp.* que generan enfermedades genitales en el ganado. Fue aislado por primera vez en 1947, posteriormente numerosos estudios en todo el mundo demostraron su presencia en el tracto genital de vacas y toros, tanto sanos como enfermos (Doig, 1981). En vacas sanas, se logró aislar *M. bovis* de muestras de moco cervicovaginal y vulva, aunque en muy baja proporción. Las tasas de aislamiento más altas se obtuvieron de vacas infértiles y que padecían vulvitis granular (Tourtellotte *et al.* 1976). Sin embargo,

también se lo asoció a casos de mastitis en bovinos por lo que se lo cataloga como un microorganismo comensal capaz de habitar diferentes órganos genitales de bovinos.

M. bovigentialium fue aislado de semen y lavados prepuciales de toros proveniente de centros de IA con alto nivel de contaminación, y se ha demostrado la propagación del organismo de los toros afectados a las vacas. Cuando infecta los testículos o el epidídimo puede afectar la calidad del semen, especialmente después de la criopreservación (Fish *et al.* 1985; Parkinson, 2019). Actualmente se cuenta con poca evidencia que demuestre si *M. bovigentialium* podría ser capaz de generar un efecto perjudicial sobre la fertilidad (Doig, 1981). Por lo tanto, se requieren estudios que ayuden a aclarar el papel de *M. bovigentialium* en las enfermedades reproductivas bovinas.

1.4.2. *Chlamydia spp.*

Pertenece a la familia Chlamydiaceae y comprende los géneros *Chlamydophila* y *Chlamydia* (Reinhold *et al.* 2011). Actualmente, se reconocen 11 especies *Chlamydia* (*C.*) entre las que se encuentran *C. abortus*, *C. pecorum*, *C. psittaci*, *C. pneumoniae*, *C. felis*, *C. caviae*, *C. trachomatis*, *C. suis*, *C. muridarum*, *C. avium* y *C. gallinácea* (Sachse *et al.* 2014). *Chlamydia spp.* es una bacteria Gram-negativa intracelular obligada. Presenta uno de los genomas más pequeños entre las bacterias que varía entre 1,1-1,24 Mpb (Schautteet y Vanrompay, 2011). Es capaz de evadir la respuesta inmunitaria colonizando monocitos y macrófagos, replicándose y garantizando su supervivencia en el organismo huésped. Se multiplica por fisión binaria y presenta un único ciclo de crecimiento bifásico con dos formas morfológicas distinguibles, una forma extracelular e infecciosa denominada cuerpo elemental y una forma replicativa metabólicamente activa llamada cuerpo reticular (Schautteet y Vanrompay, 2011; Rojas, 2014). El cuerpo elemental es el encargado de invadir la célula huésped y sobrevivir en el medio ambiente como agente infeccioso no replicante, presentan un tamaño de aproximadamente 0,3 µm de diámetro; mientras que el cuerpo reticulado reside y se multiplica dentro del huésped en una inclusión citoplásmica similar a una vacuola como agente no infeccioso. Son metabólicamente activos, con un citoplasma rico en ribosomas y un tamaño de aproximadamente 1 µm de diámetro. Los cuerpos elementales contienen un ADN genómico muy enrollado cubierto por proteínas similares a las histonas (Rodolakis y Laroucau, 2015; Reinhold *et al.* 2011). Su desarrollo depende principalmente del suministro de nutrientes y del estado metabólico de la célula

huésped, así como de una respuesta inmune ineficaz que da como resultado una infección persistente en el huésped. (Reinhold *et al.* 2011). Los cuerpos elementales logran eludir los mecanismos de defensa naturales del huésped a través de inclusiones que impiden su fusión con lisosomas, entrando en la vía exocítica convirtiéndose en vacuolas secretoras. El ciclo de desarrollo se completa cuando los cuerpos reticulados se vuelven a transformar en cuerpos elementales, los cuales son liberados por lisis o exocitosis de la célula huésped iniciando una nueva ronda de infección (Rodolakis y Laroucau, 2015). Las diferencias en cuanto a infectividad y replicación determinan el grado de virulencia de las cepas de *Chlamydia*. Son capaces de generar productos levemente tóxicos consecuencia de la expresión del gen de toxina putativo (*tox*), que es muy similar al gen citotóxico que se encuentra en *Escherichia coli* enterohemorrágico, cuya acción afecta el citoesqueleto de actina (Reinhold *et al.* 2011). Ciertas especies del género *Chlamydia* se consideran patógenos de importancia en la salud humana y animal ya que son responsables de un amplio número de enfermedades, ya que son capaces de replicarse en células de la mucosa epitelial, respiratoria, urogenital y del tracto gastrointestinal (Schautteet y Vanrompay, 2011). Determinadas especies de *Chlamydia spp.* son capaces de comportarse como específicas de hospedador e incluso de cruzar la barrera intra-especies, llegando a provocar enfermedades zoonóticas (Bayramova *et al.* 2018). Han sido detectadas en muestras procedentes de heces, secreciones vulvares/oculares/nasales, fluidos uterinos, membranas placentarias, orina y semen. Por efecto, las vías de transmisión pueden ser fecal-oral, oronasal y venérea, siendo elevadas las posibilidades de infección y dispersión de este agente (Longbottom y Coulter, 2003; Kemmerling *et al.* 2009).

Dentro de las especies de *Chlamydia spp.* que fueron identificadas en el ganado bovino se encuentran *C. abortus*, *C. pecorum*, y *C. psittaci* (Longbottom y Coulter, 2003; Kaltenboeck *et al.* 2005). *C. pecorum*, ocasiona infecciones intestinales, articulares y oculares; *C. abortus* genera infecciones genitales y abortos ocasionales; *C. psittaci* infecciones respiratorias. *C. abortus*, es endémica en rumiantes a nivel mundial y los abortos a los que se lo vincula ocurren entre el sexto y octavo mes de gestación (Reinhold *et al.* 2011; Rojas *et al.* 2018). Aunque este grupo microbiano no es considerado una amenaza para la industria ganadera, es responsable de numerosos abortos esporádicos en rodeos y se estima que es capaz de afectar al 20% de las vacas preñadas. Al ser patógenos intracelulares tienen el potencial de causar infecciones agudas como crónicas, siendo

capaces de persistir y reactivarse causando infecciones recurrentes (Reinhold *et al.* 2008). Su capacidad de generar infecciones sobre múltiples órganos combinada con su distribución ubicua facilita la infección prolongada en ubre, tractos respiratorio, reproductivo e intestinal (Kaltenboeck *et al.* 2005).

En el hombre, el toro, el carnero y el jabalí se detectó *Chlamydia spp.* en semen y se lo relacionó con infecciones como uretritis y prostatitis (Kauffold *et al.* 2007). Su presencia en el semen se correlaciona con reducción en la motilidad y el aumento de morfologías anormales en los espermatozoides, pero no se encontró un impacto significativo en la calidad y la fertilidad del semen (Eckert *et al.* 2019). En humanos se observó que *C. trachomatis* se transmite a las mujeres a través del semen (Reinhold *et al.* 2011). Asimismo, antecedentes epidemiológicos en ruminantes indican la presencia de diferentes especies de *Chlamydia spp.* en semen bovino. Por lo que, se propone que el semen podría actuar como vehículo de transmisión viable (Kaltenboeck *et al.* 2005; Eckert *et al.* 2019). En rebaños estudiados, se evidenció una elevada seroprevalencia de *Chlamydia spp.* y no parecía haber diferencia entre las granjas seleccionadas al azar y las pre-seleccionadas por problemas de salud específicos, lo que ha llevado a suponer que las infecciones por *Chlamydia spp.* son omnipresentes en el ganado (Kaltenboeck *et al.* 2005).

Por otro lado, se observó la presencia de *Chlamydia spp.* en el epidídimo de toros que padecían vesiculitis consecuencia de la inoculación artificial con *C. psittaci*. Se observó que los parámetros estándar de eyaculación no difirieron entre animales con semen infectado de los que no (Kauffold *et al.* 2007). La transmisión venérea a través de toros es posible tanto por apareamiento natural como por IA, debido a que vacas inseminadas con semen infectado desarrollaron en consecuencia clamidiasis genital que afectó la función placentaria y provocó abortos o muertes perinatales (Kaltenboeck *et al.* 2005). No se ha informado casos de transmisión intrauterina, pero puede generarse transmisión vertical durante el parto. Dichos novillos actuarían como vector de infección, ya que se observó que los terneros al nacer parecían libres de *Chlamydia*, pero se detectó su presencia luego de dos semanas (Reinhold *et al.* 2008). Toda esta evidencia acumulada indica que *Chlamydia spp.* juega un papel perjudicial en la reproducción del ganado bovino, pero lamentablemente las posibles causas de su infección aún no son claras (Kaltenboeck *et al.* 2005; Kauffold *et al.* 2007).

El único trabajo publicado en Argentina sobre la infección por *Chlamydia spp.* en bovinos indicó que el 23% de los animales estudiados presentaba anticuerpos específicos, pero que a pesar del rol patogénico y su capacidad para producir distintas infecciones su diagnóstico no se realiza habitualmente (Rojas *et al.* 2018). Dicho diagnóstico requiere la aplicación de técnicas muy sensibles, ya que la detección serológica para estimar la prevalencia de una infección por *Chlamydia spp.* no es la más adecuada ya que puede ocurrir que el animal no genera una respuesta inmunológica, proporcionando falsos negativos. Numerosos métodos inmunohistoquímicos se suelen utilizar, pero no existe una técnica capaz de diferenciar los anticuerpos para *Chlamydia* a nivel de especies. Las metodologías basadas en el diagnóstico molecular mediante PCR permitieron detectar su presencia con mayor frecuencia en el ganado bovino (Rojas, 2014; Reinhold *et al.* 2008) en muestras provenientes de abortos y partos prematuros perinatales de terneros (Sachse *et al.* 2014). El impacto en la producción bovina que pueden generar las infecciones por *Chlamydia spp.* constituye hoy día un interrogante. Por ello, las investigaciones futuras deberían estar dirigidas a analizar el impacto sobre el bienestar animal y principalmente sobre la reproducción bovina.

1.4.3. *Ureaplasma spp.*:

El género *Ureaplasma* es uno de los tres géneros de la familia Mycoplasmataceae. Pertenece al filo *Tenericutes*, clase *Mollicutes* y orden *Mycoplasmatales* (Neres Santos Junior *et al.* 2021). Estos microorganismos parecen descender de las bacterias Gram-positivas y presentan una alta especificidad de hospedador (García, 2013).

1.4.3.1. *Ureaplasma diversum*

Entre las especies conocidas del género, *Ureaplasma diversum* (*U. diversum*) es la única descrita en bovinos e incluye tres serovariedades con distinto grado de patogenicidad. Se aisló por primera vez en 1967, a partir de muestras de tejido provenientes de vagina, uretra, ubre y de la vejiga de las vacas (Neres Santos Junior *et al.* 2021). En Argentina, su detección fue informada por primera vez en el año 2017 a partir de muestras de raspado prepuccial de toros aparentemente sanos (Sosa *et al.* 2018). El genoma completo de *U. diversum* comprende 975.425 pb en un solo cromosoma circular, con un contenido de G+C del 28,1% (Marques *et al.* 2015). No presentan una vía de arginina deshidrolasa completa por lo que la hidrólisis de urea juega un papel importante en su metabolismo energético

como fuente de energía para la producción de ATP (Neres Santos Junior *et al.* 2021). En términos morfológicos, *U. diversum* comparte las características generales de la clase *Mollicutes*: son pleomórficos, cocoides o cocobacilares, con un tamaño que varía entre 400 a 500 nm, presenta microaerófilos (Marques *et al.* 2009). Son microorganismos intracelulares facultativos, formados por adhesinas que facilitan su invasión celular, permitiendo que utilicen los nutrientes de la célula huésped. Una vez adheridos, estas bacterias interactúan con los receptores de la membrana o interfieren con el mecanismo de transporte de las células huésped haciéndolas vulnerables a los metabolitos citotóxicos y las actividades de las enzimas citolíticas (Neres Santo Junior *et al.* 2021). A nivel molecular, se sabe que puede inducir fragmentación del ADN ya sea por descondensación, desnaturalización o por rupturas de las cadenas de ADN por lo que pueden provocar daño espermático inmediato, o más tarde causar problemas en el desarrollo y la implantación embrionaria (Lozano, 2009). Se consideran patógenos oportunistas que habitan las membranas mucosas y las secreciones del tracto respiratorio y reproductivo, siendo posible aislarlos desde la mucosidad prepucial y vaginal, la secreción conjuntival, semen y en la leche. Presentan cepas patogénicas y no patogénicas, que se diferencian de las cepas de *Mycoplasma spp.* por su capacidad para catabolizar urea. Inicialmente, se los consideraban como una especie no patogénica pero recientemente se demostró que son capaces de causar daños tanto en órganos como en células bovinas (Smith *et al.* 2012). Al igual que *Mycoplasma spp.* se los puede encontrar en animales aparentemente sanos, por lo que se cuenta con escasos registros a nivel mundial (Rojas *et al.* 2019).

En toros, *U. diversum* se asoció con casos de vesiculitis, balanopostitis, epididimitis, siendo capaces de colonizar las porciones proximales/distales de la uretra y la cavidad prepucial, lo que permite la contaminación del semen (Hobson *et al.* 2013) y provocar cambios morfológicos y funcionales en los espermatozoides (Buzinhani *et al.* 2011). En toros sanos (sin lesiones genitales) pero positivos para *U. diversum* se observó que sus espermatozoides presentaban colas anormales (dobladadas y enrolladas), anomalías en la superficie del espermatozoide como pequeñas protuberancias, e irregularidades desde la cabeza hasta la cola. Esto sugiere que la adherencia de este microorganismo interfiere con la espermatogénesis, el transporte de espermatozoides, la capacitación y la fecundación (Hobson *et al.* 2013). Ball y col. (1987) y Le Grand y col. (1995) han identificado *U. diversum* en fluidos del tracto reproductivo del toro incluido semen fresco, muestras de moco prepucial y

secreción uretral distal. Además, Le Grand y col. (1995) detectaron una frecuencia de 74% de *U. diversum* en semen de toros destinados a la IA y demostraron que el mismo era capaz de colonizar blastocistos y fetos, e inducir posteriormente pérdidas gestacionales o el nacimiento de terneros débiles.

En las hembras, la presencia de *U. diversum* se asocia con insuficiencias reproductivas como vulvovaginitis granular, endometritis, salpingitis, muerte embrionaria temprana, terneros nacidos débiles y tasas de concepción disminuidas (Smith *et al.* 2012). Pese a que la supervivencia de estos microorganismos está comprometida en el útero y que requieren un entorno microaerófilo para su crecimiento, en situaciones favorables como durante el estro cuando el cuello uterino está abierto o durante la IA, la infección se torna más probable permitiendo su adherencia a las células epiteliales, lo que asegura su supervivencia (Smith *et al.* 2012). Bronwyn-Crane y Hughes (2018) demostraron que vaquillonas infectadas con *U. diversum* no tuvieron problemas de fertilidad, pero presentaron partos prematuros y muerte fetal. Esto sugiere que los embriones afectados por *U. diversum* son una fuente de infección para vacas, por lo que se podría desencadenar abortos, la mortalidad o el nacimiento de terneros débiles como manifestaciones clínicas características de su infección. Además, Bronwyn-Crane y Hughes (2018) demostraron que *U. diversum* puede colonizar las células del feto durante el desarrollo temprano, sin generar efectos citopáticos. De esta manera, posteriormente puede colonizar la conjuntiva ocular y el tejido pulmonar en las últimas etapas del desarrollo o después del parto, causando placentitis pulmonar y conjuntivitis en terneros.

U. diversum tiene características particulares que dificultan su control en el ganado vacuno (Neres Santos Junior *et al.* 2021). Los métodos de detección tradicionales de cultivo presentan requerimientos y complicaciones para su crecimiento en un medio sólido: producen colonias de tamaño similar a otros microorganismos del género *Ureaplasma* dificultando su correcta diferenciación; tienen una temperatura de crecimiento óptima de 37°C y su pH óptimo oscila entre 6-7; requiere la suplementación de urea en el medio ya que a través de su hidrólisis forma amoníaco y le permite aumentar el pH *in vitro*, característica distintiva de los *Ureaplasmas* que los diferencia de otros *Mollicutes*. Estudios recientes demuestran que la utilización de métodos de diagnóstico molecular proporciona mejores resultados para detectar especies de *Ureaplasma* en bovinos, debido a que su sensibilidad de detección es mayor que la de los cultivos (Smith *et al.* 2012). Actualmente,

la implementación de técnicas de PCR para la detección de *U. diversum* en el ganado, mediante la amplificación de la secuencia génica conservada del ARNr 16S, resulta ser una metodología prometedora para proporcionar un rápido diagnóstico y una detección precisa que ayude a controlar la transmisión de este microorganismo en los rodeos (Marques *et al.* 2009; Neres Santos Junior *et al.* 2021).

1.5.ROL DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN LA DETECCIÓN DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS

Actualmente, el empleo de técnicas moleculares en el diagnóstico veterinario permitió la detección de material genético correspondiente a microorganismos difíciles de aislar o cultivar, muchos de los cuales pueden transmitirse a través del semen bovino (Rojas *et al.* 2019). En el caso del diagnóstico de enfermedades infecciosas no sólo permiten la detección sino también la caracterización de los microorganismos (Haapala *et al.* 2018). El diagnóstico molecular está revolucionando la práctica clínica frente a las enfermedades infecciosas, su importancia radica en la oportunidad de un diagnóstico oportuno y preciso, fundamental para la toma de decisiones sobre el tratamiento y el manejo de las infecciones (Yang y Rothman, 2004). La PCR es la técnica molecular más perfeccionada actualmente. Esta técnica fue desarrollada por Kary Banks Mullis en 1983 revolucionando la biología molecular y la forma de estudiar los ácidos nucleicos (Tamay de Dios *et al.* 2013). Comprende una reacción enzimática *in vitro* que amplifica una secuencia específica de ADN de interés durante ciclos repetidos, en los cuales la secuencia diana es copiada fielmente millones de veces a través del accionar de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente nuevas cadenas de ADN en las células. Los diversos métodos de detección basados en la PCR requieren la aplicación de tecnologías avanzadas para garantizar automatización, sensibilidad y especificidad con el fin de asegurar la capacidad para detectar agentes infecciosos de interés (Santis y Evans, 1999). Permite una gran variedad de aplicaciones clínicas, entre las cuales se destaca la detección de patógenos específicos o de amplio espectro, la evaluación de infecciones emergentes, el seguimiento y la detección temprana de agentes biológicos, así como la elaboración de perfiles de resistencia antimicrobiana. A medida que los diagnósticos moleculares van adquiriendo mayor prestigio tanto entre los veterinarios como en los propios productores agropecuarios o cabañeros, se vuelve más consciente el potencial práctico de esta

tecnología, respecto de las limitaciones de los ensayos tradicionales (Yang y Rothman, 2004). Actualmente, su aplicación como una herramienta de rutina en los laboratorios de diagnóstico para detectar y/o caracterizar organismos causantes de enfermedades a partir de muestras provenientes de individuos afectados se va haciendo más popular (James, 2010). Numerosos diagnósticos ya se han desarrollado exitosamente para una amplia gama de microorganismos. Antecedentes de expertos en enfermedades infecciosas aseguran que la PCR podría convertirse en la mejor herramienta para identificar organismos que no se pueden cultivar *in vitro* o cuando las técnicas de cultivo existentes son insensibles y/o necesitan tiempos prolongados de incubación (Santis y Evans, 1999). Por otro lado, las pruebas de PCR requieren ser planificadas y efectuadas por personal experimentado, en áreas de laboratorio apropiadas y mediante la aplicación de buenas prácticas de laboratorio de biología molecular. La inclusión de controles para alertar sobre la posibilidad de resultados falsos negativos y/o positivos resulta esencial para monitorear el desempeño del ensayo y dar tranquilidad en cuanto a la calidad y precisión de los resultados (James, 2010).

Con el desarrollo de este trabajo se espera aportar información respecto de la presencia de *Mycoplasma spp.*, *Chlamydia spp.* y *Ureaplasma spp.* en semen bovino de origen comercial y establecer el efecto que tiene su detección sobre la calidad seminal. Debido a que existen suficientes evidencias que demuestran que el uso del semen a través de la IA podría contribuir a la transmisión de enfermedades infecciosas y que la calidad seminal de los toros donantes podría verse afectada por la presencia de ciertos microorganismos que tienen el potencial de comportarse como agentes infecciosos, desencadenar fallas reproductivas en el ganado e incluso desarrollar enfermedades zoonóticas (Marques *et al.* 2009). Además, se espera generar uno de los primeros reportes de la circulación de especies que comprenden los géneros *Mycoplasma spp.*, *Chlamydia spp.* y *Ureaplasma spp.* en muestras de semen criopreservado de Argentina y que dicha información sea la base de futuras estrategias de evaluación de prevalencias, prevención y control de las mismas.

2. HIPÓTESIS

Es posible detectar, mediante la implementación de técnicas de PCR, genes correspondientes a diferentes especies de *Mycoplasma spp*, *Chlamydia spp* y *Ureaplasma spp* en muestras de semen de bovino criopreservado de origen comercial. La presencia de estos genes se correlaciona negativamente con los parámetros de calidad seminal.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Determinar mediante técnicas moleculares (PCR), la presencia de genes marcadores de *Mycoplasma spp.*, *Chlamydia spp.* y *Ureaplasma spp.*, en muestras de semen de bovino criopreservado de origen comercial y determinar el efecto de la presencia de los mismos sobre la calidad seminal.

3.2. Objetivos específicos

- ❖ Poner a punto la técnica de extracción de ADN de muestras de semen bovino criopreservado y las reacciones de PCR para determinar genes de *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma californicum*, *Mycoplasma bovis genitalium*, *Chlamydia spp.* y *Ureaplasma diversum*.
- ❖ Determinar la presencia de genes marcadores de *Mycoplasma spp*, *Chlamydia spp* y *Ureaplasma spp.* en muestras de semen bovino criopreservado de origen comercial.
- ❖ Evaluar los niveles de prevalencia de dichos genes en muestras de semen bovino de origen comercial.
- ❖ Correlacionar la presencia de los genes de los agentes mencionados con diferentes parámetros de calidad seminal.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se llevó a cabo en los laboratorios del Área de Producción Animal, de la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Marcos Juárez del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), ubicada en la Ruta Provincial 12 km 3, Marcos Juárez Provincia de Córdoba, Argentina.

4.1. MUESTRA O POBLACIÓN

Se evaluaron 94 pajuelas de semen bovino criopreservado de origen comercial correspondientes a 60 eyaculados provenientes de 60 toros adultos, de 7 centros de reproducción bovina. Más de una pajuela provenía de un mismo eyaculado de un único toro. Los toros donantes de semen se encontraban libres de entidades infecciosas específicas transmisibles a través del semen (brucelosis, leptospirosis, campilobacteriosis, rinotraqueitis infecciosa bovina, diarrea viral bovina, tuberculosis y leucosis infecciosa bovina) siguiendo las reglamentaciones vigentes. Las muestras se almacenaron en un termo con nitrógeno líquido hasta el momento de su evaluación.

4.2. EVALUACIONES DE CALIDAD SEMINAL

Las muestras de semen almacenadas en nitrógeno líquido a -196°C fueron descongeladas en baño María a 37°C durante un minuto. Luego, el contenido de las pajuelas se evaluó en dos tiempos diferentes: T1 (momento de descongelación) y T2 (120 minutos post-descongelación) para realizar las siguientes evaluaciones de calidad seminal.

- **Movilidad espermática total (MET):** Este método consiste en visualizar y estimar subjetivamente la proporción (%) de espermatozoides móviles, mediante la observación de al menos 3 campos microscópicos, utilizando un microscopio óptico (40x). Para ello, se colocó una alícuota de 6 μl de semen entre porta y cubreobjetos sobre una platina térmica a 37°C .
- **Movilidad rectilínea progresiva (MRP):** Esta técnica consiste en visualizar y estimar subjetivamente la proporción (%) de espermatozoides móviles con desplazamiento de avance. Una alícuota de 6 μl de semen se colocó entre porta y cubreobjetos y se observó en un microscopio óptico (40x).

- **Integridad de la membrana plasmática (IMP):** Las muestras fueron coloreadas con eosina y nigrosina, según una modificación del método descrito por Mortimer (1994). Se colocó una alícuota de 6 µl de la muestra sobre un portaobjetos y al lado de ésta, una alícuota (10 µl) de la solución de eosina-nigrosina. Ambas gotas fueron mezcladas y debidamente homogeneizadas durante 10 segundos para posteriormente efectuar un frotis que fue secado sobre platina térmica a 37 ° C. Los espermatozoides total o parcialmente coloreados (rosado-violeta) fueron considerados como células con alteraciones de la integridad de membrana plasmática (MP), mientras que aquellos que no se tiñeron (blanco) se consideraron como células con la MP intacta. Se contaron 200 células en un microscopio óptico (40x) y se calculó el porcentaje de los espermatozoides sin alteraciones de la MP.
- **Funcionalidad de la membrana plasmática del compartimiento flagelar (HOS Test):** Se utilizó un método basado en el descrito por Jeyendran *et al.* (1984) para la especie humana, adaptado al estudio de semen de bovino. Una alícuota de 50 µl de semen se incubó en BM a 37°C durante 30 minutos, en 500 µl de un medio hiposmótico ajustado a 100 mOsm/l. Una gota (6 µl) se colocó entre porta y cubreobjetos, y microscópicamente (40x) se contaron un máximo de 200 células. Se consideraron células positivas (espermatozoides con flagelo enrollado=HOS+) y negativas en los casos en que el flagelo se encontraba recto o en forma de látigo (HOS-).

Luego de la evaluación seminal de cada pajueta, el contenido sobrante fue almacenado en criotubos en freezer de -80°C hasta el momento en que se descongeló para realizar la extracción de ADN de las mismas.

4.3. EXTRACCIÓN DE ADN DE MUESTRAS DE SEMEN BOVINO CRIOPRESERVADO

Primero, se realizó la extracción de ADN en 20 muestras para probar la eficacia de un protocolo tradicional que ya se usaba en el laboratorio para procesar las muestras. La misma consistió en centrifugar cada muestra con semen bovino a 12000 rpm, durante 7 minutos para concentrarla. Se descartó el sobrenadante y se suspendió el pellet en 1 ml de solución de lavado y se centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos. Luego se resuspendió el pellet con 1000 µl de solución de digestión, más 10 µl de proteinasa K. Se sometió a

vortex a cada muestra y se las incubó en la estufa durante una hora a 56°C, con agitación. Posteriormente, se añadió 1000 µl de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos. De esta solución se tomaron 700 µl de la fase superior y se lo transfirió a un tubo microtubo de 1,5 ml. Luego se agregó 700 µl de isopropanol y 70 µl de acetato de sodio 2,5 M que fue mezclado mediante inversión hasta que se visualizó ADN. Posteriormente, se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos, y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 500 µl de etanol 75%, se mezcló bien y se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos. Luego de ello, se descartó el sobrenadante de etanol y se dejó secar el pellet en la estufa a 56°C durante hora. Por último, se resuspendió en 30 µl de agua destilada y se lo dejó en la estufa 10 minutos. Para la determinación de la concentración de las muestras se utilizó un equipo, nanodrop (NanoDrop 8000). Con esta metodología no se logró obtener una cantidad adecuada de ADN, por lo que se realizó la extracción de ADN del semen con el Kit comercial de Roche®.

La extracción de ADN mediante el kit comercial se realizó a partir de una muestra descongelada que contenía 500 µl de concentración de semen bovino. Luego de la descongelación, se tomaron 250 µl que se colocaron en un microtubo de 1,5 ml al que se le agregaron 120 µl de Tissue Lysis Buffer y 20 µl de Proteasa K (o Proteínasa K) que fueron mezclados con vortex durante 15 segundos. Luego de ello, las muestras fueron centrifugadas brevemente de manera tal que no queden gotas pegadas en la cara interna de la tapa. Posteriormente, se incubaron en una estufa (Jircas, Mi-1SR) a 56°C durante una hora y media en agitación. A continuación, se agregó a cada tubo 200 µl de Binding Buffer, y se lo mezcló por inversión durante 15 segundos; luego se centrifugó brevemente y se incubó en una estufa digital (AccuBlock, Digital Dry Bath) a 70 °C durante 10 minutos. Se prosiguió agregando 100 µl de isopropanol absoluto a cada tubo, y se los mezcló por inversión por 15 segundos. Se agregaron 500 µl de Inhibidor Removal buffer; y se centrifugaron (IEC, Micromax RF) las muestras a 8000 rpm por 1 minuto. Se colocó el filtrado obtenido en una columna de purificación en un tubo colector nuevo (provisto por el kit); y se realizaron dos lavados con Wash buffer. En el primer lavado se agregaron 500 µl de dicho buffer, y en el segundo lavado 450 µl. Entre ambos lavados se realizaron sus respectivas centrifugaciones a 8000 rpm por 1 minuto; y se fueron reemplazando los tubos colectores ya utilizados por nuevos, desechando el filtrado que se obtenía en cada paso. Como último paso, se realizó una doble elución con el Buffer de Elución, ya que se

descubrió que a diferencia de como indicaba el fabricante se obtenían mejores resultados. Se colocó la columna de purificación de cada una de las muestras, en un tubo microtubo nuevo de 1,5 ml. Primero se agregaron 50 µl del Buffer de Elución, y en la segunda elución 40 µl. En cada caso, se dejó incubar a temperatura ambiente durante cinco minutos, se centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto y se descartó la columna de purificación, obteniendo en cada tubo la elución final. A partir de esta, se determinó la concentración de ADN extraído por medio de espectrofotometría a 260 nm (en Nanodrop). Los criterios de pureza aceptables son relaciones de absorbancias a $260\text{nm}/280\text{nm}=1,8$ y $260\text{nm}/230\text{nm}=1,8-2,2$.

4.4. DETECCIÓN MOLECULAR DE MICROORGANISMOS DIFÍCILES DE CULTIVAR MEDIANTE TÉCNICAS DE PCR

La detección génica de las especies de microorganismos estudiados se realizó mediante la implementación de técnicas moleculares de PCR convencional, PCR múltiple (multiplex) y PCR anidada (nested). Para esto, se emplearon *primers* anteriormente utilizados en trabajos de investigación que se detallan en la tabla 1. Los controles positivos de reacción ADN utilizados fueron cepas cedidas por el ANLIS-Instituto Dr. Carlos Malbrán y como controles negativos de reacción se utilizó agua destilada libre de DNasa y RNasa. Los procesos de ciclado se realizaron con un termociclador (BioRad) y los programas consistían en 40 ciclos de amplificación. Generalmente, cada ciclo consistió en la utilización de una temperatura inicial de desnaturalización de 94°C durante 5 minutos, la temperatura de annealing o de hibridación varió entre los 50-56°C (considerando la temperatura óptima de cada *primer*), y la temperatura final de extensión fue de 72°C durante una hora. Al finalizar las reacciones de PCR, se realizó una corrida electroforética en geles de agarosa al 2% de los productos, se empleó el agente intercalante bromuro de etidio para observar los amplicones y su revelado se realizó en un transiluminador UV-Visible.

Debido a que los ensayos realizados para amplificar la secuencia génica correspondiente a *Ureaplasma diversum* mediante PCR convencional no fueron los esperados, se decidió utilizar para su detección la técnica de PCR nested. En el caso de *Chlamydia spp.*, se utilizó la metodología de PCR multiplex, para amplificar simultáneamente la secuencia ribosomal conservada correspondiente al género, que codifica para los ARNr 23S y 16S. Las especies correspondientes al género *Mycoplasma spp.* se amplificaron exitosamente mediante la

técnica molecular de PCR convencional. Los ensayos realizados serán descritos en los siguientes apartados.

4.4.1. PCR para identificar especies específicas de *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovigenitalium* y *Mycoplasma californicum*

Los genes correspondientes a las diferentes especies estudiadas de *Mycoplasma spp.* se amplificaron mediante PCR convencional. Los protocolos propuestos por Thomas *et al.* (2004), Neder *et al.* (2019) y Kobayashi *et al.* (1998) fueron utilizados de forma modificada para optimizar la selección de *M. bovis*, *M. californicum* y *M. bovigenitalium*. Las mezclas de reacción consistieron en 6,5 µL de mezcla maestra (Promega), 0,5 µL de MgCl₂, 0,2 Taq polimerasa, 1 µL de cada *primer* (forward y reverse) y 5 µL de ADN muestra en un volumen final de 25 µL. Las condiciones de ciclado fueron 95°C durante 5 min, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 45 s, 56°C durante 1 min y 72°C durante 1 min. El ensayo se realizó en un termociclador (BioRad).

4.4.2. PCR multiplex para identificar *Chlamydia spp.*

Para *Chlamydia spp.* se amplificó la secuencia de ARNr 23S y la secuencia de ARNr 16S, según los protocolos de Everett *et al.* 1999 y Borel *et al.* 2008. Las mezclas de reacción consistieron en 6,5 µL de mezcla maestra (Promega), 0,5 µL de MgCl₂, 1 µL de Taq polimerasa, 1 µL de cada juego de *primer* y 5 µL de ADN en un volumen final de 25 µL. Las condiciones de ciclo fueron 95°C durante 5 min, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 45 s, 56°C durante 1 min y 72°C durante 1 min y se utilizó un termociclador (BioRad).

4.4.3. PCR nested para identificar *Ureaplasma diversum*

U. diversum se identificó a partir del protocolo de PCR nested modificado de Vasconcellos-Cardoso *et al.* (2000). Se efectuó con una mezcla de reacción que contenía 6,5 µL de mezcla maestra (Promega), 1 µL de cada *primer* (forward y reverse), 0,5 µL de MgCl₂, 0,2 µL de Taq polimerasa y 5 µL de ADN en un volumen final de 25 µL. El ensayo se realizó en un termociclador (BioRad) y el ciclo térmico implicó 95°C durante 5 min, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 45 s, 56°C durante 1 min y 72°C durante 1 min. Para el ensayo de PCR nested, se agregaron 0,2 µL de los productos de amplificación de PCR a la mezcla de reacción, que contenía el segundo conjunto de cebadores para el segundo ciclo de PCR.

Las condiciones térmicas y las concentraciones de los reactivos fueron las mismas que para la primera ronda de amplificación.

Tabla 1: Listado de *primers* utilizados para amplificar la secuencia génica correspondiente a cada microorganismo estudiado.

Microorganismos	Primers	Secuencias	Tamaño amplicón (pb)	Referencia
<i>Mycoplasma bovis</i>	MbovF	5'-TTACGCAAGAGAATGCTTCA-3'	1629 pb	Thomas <i>et al.</i> 2004
	MbovR	5'-TAGGAAAGCACCTATTGAT-3'		
<i>Mycoplasma californicum</i>	McaliF	5'-CCACCAAGGCAATGATGTT-3'	800 pb	Neder <i>et al.</i> 2019
	McaliR	5'-GCTAACTGGACATATACTGACA-3'		
<i>Mycoplasma bovis genitalium</i>	MbvgF	5'-CGTAGATGCCGCATGGCATTACGG-3'	600 pb	Kobayashi <i>et al.</i> 1998
	MbvgR	5'-CATTCAATATAGTGGCATTTCCTAC-3'		
<i>Chlamydia spp.</i>	U23F-Cla	5'-GATGCCTTGGCATTGATAGGCGATGAAGGA-3'	600 pb	Everett <i>et al.</i> 1999
	U23R-Cla	5'-TGGCTCATCATGCAAAAGGCA-3'		
	U16-IGF-Cla	5'-GATGAGGCATGCAAGTCGAACG-3'	278 pb	Borel <i>et al.</i> 2008
	U16-IGR-Cla	5'-CCAGTGTTGGCGGTCAATCTCTC-3'		
<i>Ureaplasma diversum</i>	UdACT1	5'-ATCTGGCACCACACCTTCTACAATGAGCTGCG-3'	840 pb	Vasconcellos-Cardoso <i>et al.</i> 2000
	UdACT2	5'-CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC-3'		
	Ud-nested F	5'-AATGTCGGCTCGCTTATGAG-3'	215 pb	Vasconcellos-Cardoso <i>et al.</i> 2000
	Ud-nested R	5'-CCTGTCATATTGTTAACCTCCGC-3'		

4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar el efecto de la presencia de los diferentes microorganismos sobre las variables de calidad seminal se realizaron pruebas de comparación de medias.

La concentración de ADN extraída de cada una de las muestras de semen bovino criopreservadas de origen comercial, se representó utilizando el método estandarizado, diagrama de cajas y bigotes (boxplots).

Con el objetivo de determinar, mediante un análisis de contingencia, si había relación entre los valores de concentración de ADN extraídos de las muestras analizadas y la presencia de los diferentes microorganismos se agrupó la concentración de ADN en dos categorías. Además, utilizando también un análisis de contingencia, se evaluó la relación de prevalencia de los microorganismos. En los casos en los que hubo una relación positiva entre los microorganismos se realizó un análisis de correspondencia múltiple con el software estadístico Infostat.

En todos los casos, el nivel de significancia fue de 0,05. En los casos que el p-valor obtenido por medio del Chi cuadrado de Pearson no era el adecuado, consecuencia que al menos el valor de una frecuencia esperada es menor que 5, se calculó mediante la corrección de Yates, utilizando la página web <http://quantpsy.org/>.

5. RESULTADOS

5.1. Cuantificación de ADN obtenido de las muestras de semen criopreservado

La concentración media de ADN extraído de las 94 pajuelas de semen bovino criopreservado fue de 14,50 (ng/μl), correspondiente a la línea más gruesa dentro de la caja amarilla, entre el cuartil superior e inferior de la figura 1. El rango de valores máximos y mínimos para dicha variable varía entre -0,93 y 121,90 (ng/μl). Los valores atípicos (puntos de datos únicos que se alejan de la media) se mantuvieron ya que representaban muestras en las que se detectaron genes para más de uno de los microorganismos estudiados (Figura 1). El material genético extraído de cada una de las pajuelas de semen bovino criopreservado presento adecuada calidad de ADN, analizado mediante corrida electroforética en geles de agarosa al 2%.

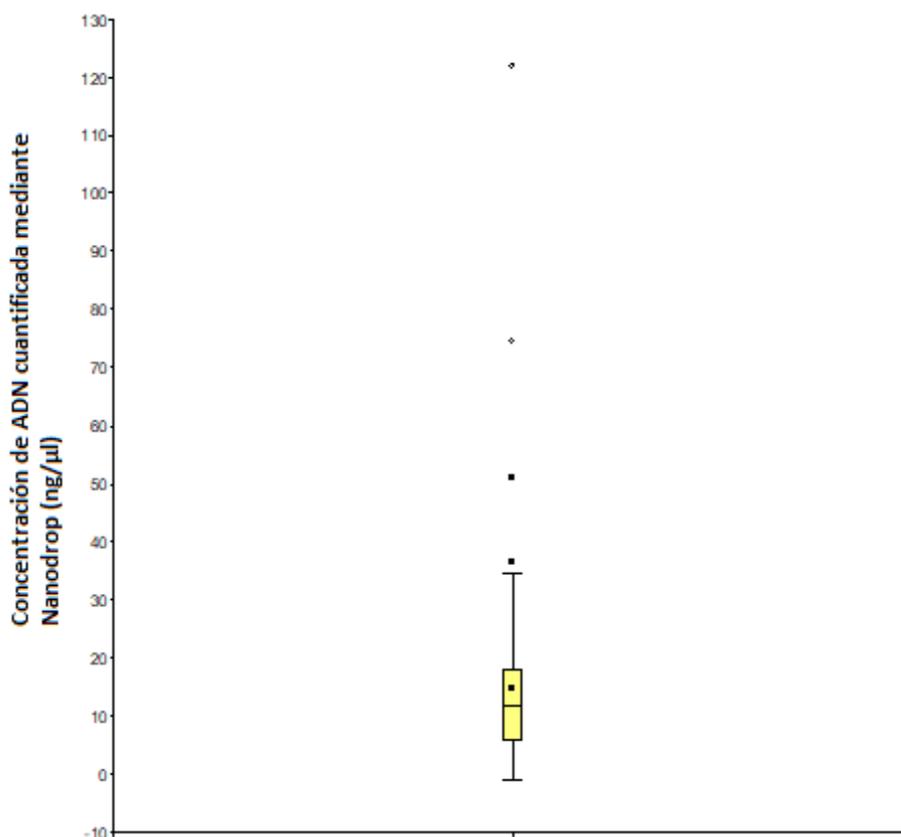


Figura 3: Boxplots con valores cuantificados de la concentración de ADN extraída mediante Nanodrop de muestras de semen bovino criopreservado de origen comercial.

5.1.1. Relación entre la concentración de ADN cuantificada y la presencia de microorganismos difíciles de cultivar

No se observó correlación positiva entre la concentración promedio de ADN extraída de las muestras de semen bovino criopreservado (14,50 ng/μl) y la presencia de *M. californicum* (p=0,2395), *M. bovigenitalium* (p=0,9231), *Chlamydia* 23S (p=0,5221), *Chlamydia* 16S (p=0,93) y *U. diversum* (p=0,78).

5.2. Prevalencia de microorganismos difíciles de cultivar en semen bovino criopreservado

La prevalencia de las especies pertenecientes a los géneros estudiados fue de 41% (39/94) para *M. californicum*, 22% (21/94) para *M. bovigenitalium*, 11% (11/94) para *U. diversum*. En cuanto al género *Chlamydia* la prevalencia fue del 47% (44/94 para el gen 23S y del 7% (6/94) para el gen 16S. No se detectó la secuencia génica correspondiente a *M. bovis* en las muestras estudiadas.

En 22/60 toros evaluados se detectaron genes correspondientes a *Chlamydia spp.* (23S y 16S) en más de una pajuela provenientes de un mismo eyaculado de un único toro. Sin embargo, este patrón no se repitió para los genes correspondientes a especies de *Mycoplasma spp.* y *Ureaplasma spp.* En la tabla 2 se presentan las frecuencias de detección de genes correspondiente a *M. bovis*, *M. californicum*, *M. bovigenitalium*, *Chlamydia spp.* y de *U. diversum* en toros donantes evaluados.

Tabla 2: Frecuencia de aparición de genes codificantes para microorganismos difíciles de cultivar en muestras de semen criopreservada correspondiente a 60 toros donantes.

Género	Especie	Frecuencia
<i>Mycoplasma</i>	<i>bovis</i>	0/60 (0%)
<i>Mycoplasma</i>	<i>californicum</i>	30/60 (50%)
<i>Mycoplasma</i>	<i>bovigenitalium</i>	18/60 (30%)
<i>Chlamydia spp.</i>	--	36/60 (60%)
<i>Ureaplasma</i>	<i>diversum</i>	10/60 (16%)

En la figura 4 se grafica la frecuencia de toros donantes de semen con aislamientos simples, dobles, triples o nulos de los microorganismos estudiados (Figura 4).

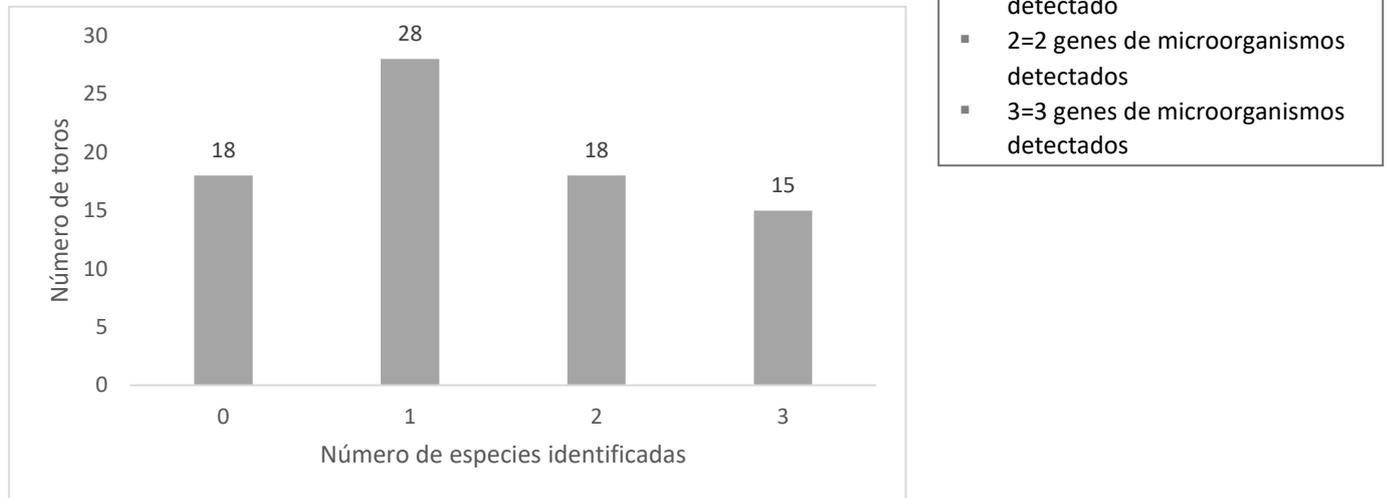


Figura 4: Frecuencia de toros donantes según el aislamiento de *M. californicum*, *M. bovis genitalium*, *Chlamydia spp.* (23S y 16S) y *U. diversum* en las muestras de semen bovino criopreservado comercial.

Se observó una tendencia en la presencia conjunta de *M. californicum* y *M. bovis genitalium* ($p=0,0945$) en una misma muestra de semen criopreservado (Figura 5). Lo mismo se observó entre *M. californicum* y *Chlamydia* (gen 16S) ($p=0,052$; Figura 6). No se evidenció relación de correspondencia en la presencia entre *M. californicum* y *Chlamydia* 23S ($p=0,8352$); *M. californicum* y *U. diversum* ($p=0,137$); *M. bovis genitalium* y *Chlamydia* 23S ($p=0,3298$); *M. bovis genitalium* y *Chlamydia* 16S ($p=0,424$); *M. bovis genitalium* y *U. diversum* ($p=0,41$); *Chlamydia* 23S y *U. diversum* ($p=0,7483$) y *Chlamydia* 16S y *U. diversum* ($p=0,69$), en las muestras analizadas.

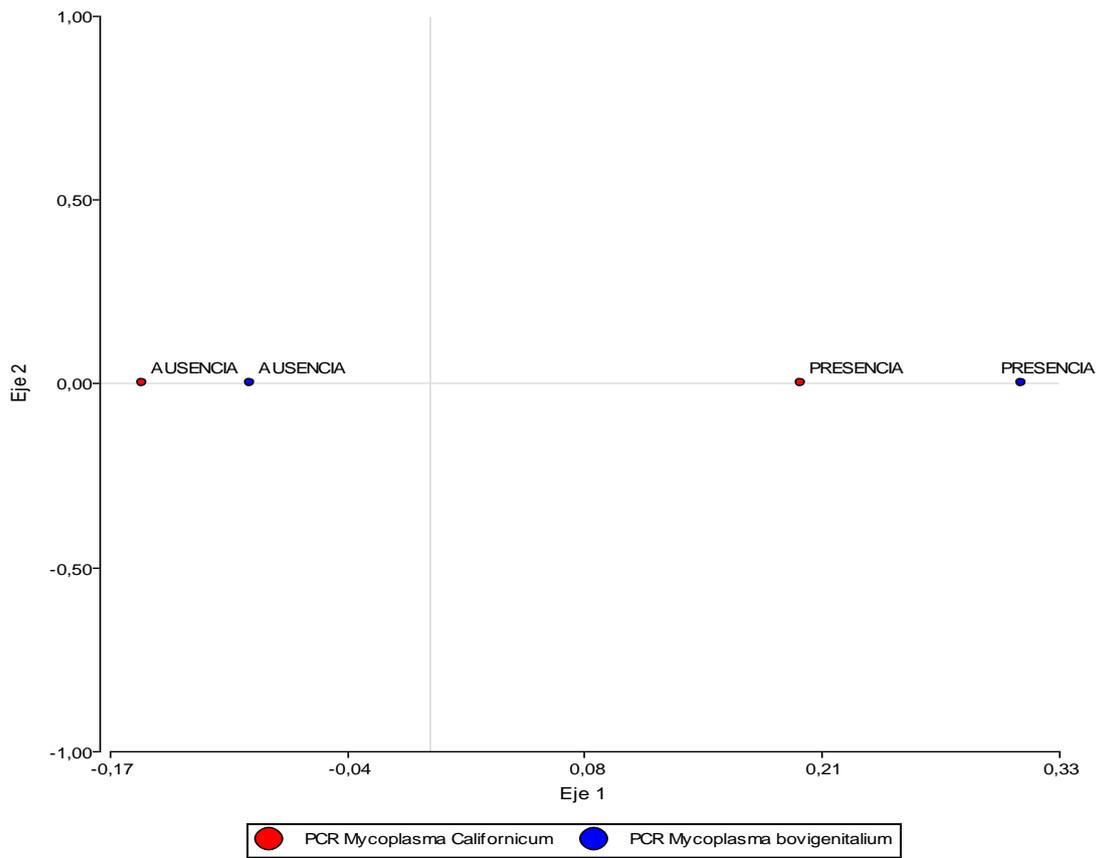


Figura 5: Análisis de correspondencia múltiple para relacionar la presencia/ausencia entre *M. Californicum* vs. *M. bovigenitalium* y *M. californicum-Chlamydia* 16S.

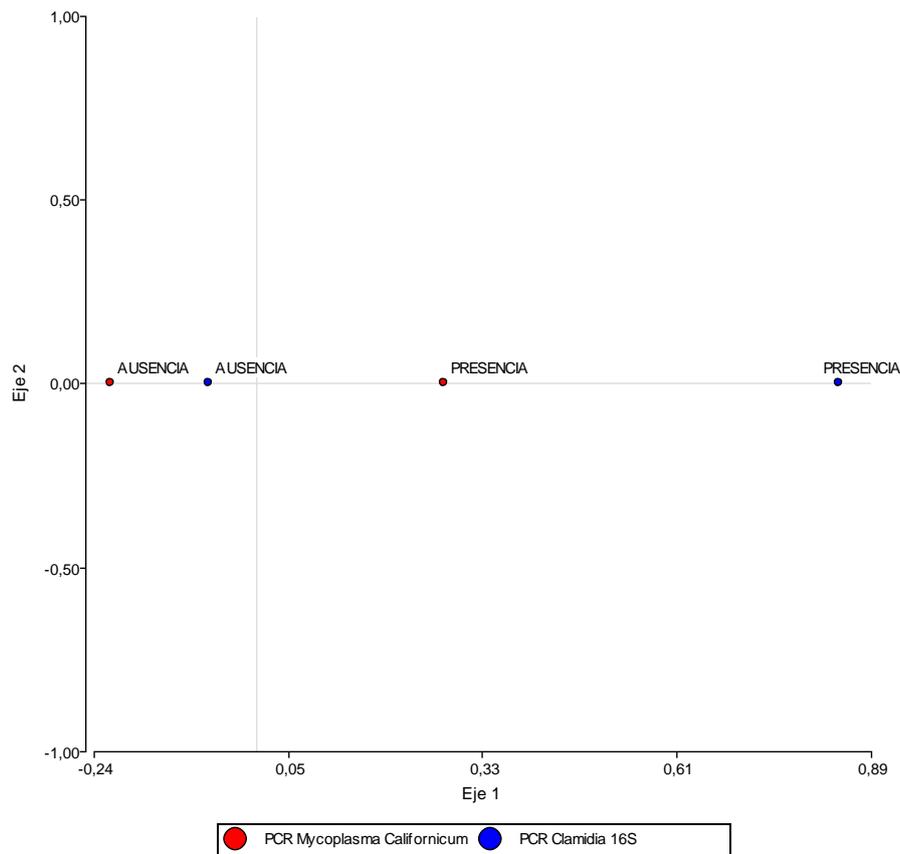


Figura 6: Análisis de correspondencia múltiple para relacionar la presencia/ausencia entre *M. californicum* vs. *Chlamydia* 16S.

5.3. Efecto de la presencia del material genético de los microorganismos evaluados sobre la calidad seminal en muestras de semen bovino criopreservado de origen comercial

Al momento de la descongelación (hora 0) y a los 120 minutos, se observó una tendencia de que la presencia de genes de *U. diversum* afecta negativamente la MET ($p=0,0818$ y $p=0,0183$; a la hora 0 y 120, respectivamente) y la MRP ($p=0,0973$ a la hora 0), siendo este efecto significativo a los 120 minutos de la descongelación ($p=0,0464$). Los valores medios y sus respectivos errores estándar se presentan en la tabla 3. Por otro lado, la presencia de material genético de *U. diversum* en las muestras analizadas no afectó la integridad ni la funcionalidad de la membrana plasmática del compartimiento flagelar de los espermatozoides evaluados ($p>0,05$; Tabla 3).

Tabla 3: Variables de calidad seminal en muestras de semen bovino criopreservado (media± E.E) respecto a la ausencia/presencia de *Ureaplasma diversum* en dos tiempos a la descongelación.

VARIABLES DE CALIDAD SEMINAL	TIEMPO 1			TIEMPO 2		
	AUSENCIA	PRESENCIA	p-VALOR	AUSENCIA	PRESENCIA	p-VALOR
Movilidad espermática total	54,52 ± 1,41	47,3 ± 3,8	0,0818	28,1 ± 1,2	20,0 ± 3,0	0,0183
Movilidad rectilínea progresiva	44,10 ± 1,39	37,3 ± 3,8	0,0973	16,4 ± 0,9	10,9 ± 2,3	0,0464
Integridad de membrana plasmática	36,23 ± 1,74	38,4 ± 5,1	0,6771	26,3 ± 1,4	26,8 ± 3,5	0,9040
Funcionalidad de membrana plasmática	32,42 ± 1,18	30,9 ± 2,5	0,6642	26,7 ± 1,0	26,4 ± 2,1	0,9278

La presencia de *M. californicum*, *M. bovis genitalium* (tabla 4) y *Chlamydia spp.* (genes 16S y 23S; tabla 5) en las pajuelas de semen bovino criopreservadas analizadas no afectó las variables de calidad seminal evaluadas en los dos tiempos ($p > 0,05$).

Tabla 4: Variables de calidad seminal de semen bovino criopreservado (media± E.E) en presencia de *Mycoplasma californicum* y *Mycoplasma bovis genitalium* al momento de la descongelación (hora 0) y a los 120 minutos de la misma.

VARIABLES DE CALIDAD SEMINAL	<i>M. californicum</i>		<i>M. bovisgenitalium</i>	
	TIEMPO 1	TIEMPO 2	TIEMPO 1	TIEMPO 2
Movilidad espermática total	56,7 ± 2,2	29,0 ± 1,7	57,0 ± 3,1	29,1 ± 2,5
Movilidad rectilínea progresiva	45,8 ± 2,2	16,3 ± 1,2	46,8 ± 3,2	17,1 ± 1,7
Integridad de membrana plasmática	34,6 ± 2,5	26,3 ± 2,0	38,5 ± 3,6	24,9 ± 2,5
Funcionalidad de membrana plasmática	32,8 ± 1,7	27,2 ± 1,3	32,9 ± 2,3	26,8 ± 2,3

Tabla 5: Variables de calidad seminal de semen bovino criopreservado (media± E.E) en presencia de *Chlamydia spp.* (genes 23S y 16S) en los tiempos de descongelación analizados.

VARIABLES DE CALIDAD SEMINAL	<i>Chlamydia 23S</i>		<i>Chlamydia 16S</i>	
	TIEMPO 0	TIEMPO 120	TIEMPO 0	TIEMPO 120
Movilidad espermática total	56,3 ± 1,9	27,9 ± 1,6	68,6 ± 5,1	38,6 ± 3,4
Movilidad rectilínea progresiva	45,5 ± 1,9	16,5 ± 1,2	57,1 ± 4,2	22,9 ± 2,9
Integridad de membrana plasmática	38,9 ± 2,5	26,9 ± 1,9	35,1 ± 8,5	22,5 ± 8,0
Funcionalidad de membrana plasmática	32,8 ± 1,6	27,6 ± 1,3	41,3 ± 4,5	35,8 ± 3,9

8. DISCUSIÓN

Nuestros resultados demuestran que mediante la técnica de PCR es posible detectar genes codificantes para *Mycoplasma californicum*, *Mycoplasma bovis*, *Ureaplasma diversum* y *Chlamydia spp.* (genes 16S y 23S) en muestras de semen bovino criopreservado de origen comercial. Además, entre las diferentes técnicas moleculares, la PCR adquiere protagonismo en el diagnóstico ya que permite la detección de microorganismos que son difíciles de cultivar y aislar, utilizando las técnicas de detección tradicionales. Estas determinaciones no se realizan de manera rutinaria en los reproductores donantes, por lo que el semen bovino podría representar una fuente de difusión de estos microorganismos dentro y fuera del país. Según estadísticas mundiales, más del 95% de las inseminaciones en bovinos se realizan con semen congelado (Thibier y Wagner, 2002). Sólo en Argentina, según los últimos datos publicados en el año 2016 por la Cámara Argentina de Biotecnología e Inseminación Artificial (CABIA), se comercializaron cerca de 6 millones de dosis de semen mostrando en los últimos años un importante incremento (CABIA, 2016). En el comercio mundial de semen congelado de toros aumenta la necesidad de criterios estrictos para garantizar la bioseguridad del semen criopreservado (Bolarín-Guillén, 2011). En este contexto, el surgimiento de nuevas metodologías moleculares para detectar agentes etiológicos no buscados rutinariamente y que pueden ser causantes de enfermedades en el ganado bovino, se presenta como una alternativa para aumentar la detección y evitar la difusión masiva de las mismas. Este trabajo es el primer informe sobre la presencia de *M. californicum*, *M. bovis*, *U. diversum* y *Chlamydia spp.* en muestras de semen bovino criopreservado de origen comercial. Los resultados muestran una prevalencia superior al 40% para *M. Californicum* y para *Chlamydia spp.* (gen 23S), superior al 20% para *M. bovis*, y cercana al 10% para *U. diversum*, y para *Chlamydia spp.* (gen 16S) en las pajuelas de semen bovino evaluadas. Además, la frecuencia de aparición de genes codificantes para los microorganismos estudiados en los 60 toros evaluados fue superior al 20% en todos los casos y en el 25% de los positivos se detectó más de un agente. En coincidencia con este resultado, Rojas *et al.* (2019) reportaron que en muestras de semen bovino fresco se detectó genes correspondientes a *U. diversum* en el 92,8% (13/14) de las cabañas evaluadas y en el 60,5% (26/43) de las muestras estudiadas. Esto demuestra la importancia que tiene la implementación de esta metodología ya que, el semen no es solo vehículo de genes

mejoradores, sino también de genes de microorganismos que podrían generar enfermedades.

A diferencia de lo observado para *Chlamydia spp.* (genes 23S y 16), en el caso de *M. californicum*, *M. bovis genitalium* y *U. diversum* no se pudieron amplificar los respectivos genes codificantes en todas las pajuelas del mismo eyaculado proveniente de un mismo toro. Estos resultados podrían deberse a la baja concentración de ADN de cada microorganismo presente en las muestras, lo que afectaría la detección en todas las pajuelas correspondientes a un mismo eyaculado. Por ello, sería necesario la realización de futuros trabajos que cuantifiquen la concentración específica de ADN de cada microorganismo. Por otro lado, debe destacarse que la detección de *Chlamydia* se realizó amplificando la secuencia génica correspondiente al género, y para los demás microorganismos se amplificó la secuencia génica correspondiente a una especie específica, lo que también podría explicar la intermitencia en la detección de dichas pajuelas.

La calidad seminal no fue afectada por la presencia del material genético de *M. californicum*, *M. bovis genitalium* (tabla 4) y *Chlamydia spp.* (genes 16S y 23S; tabla 5). Según los datos reportados por Eckert *et al.* (2019) estudiaron la interacción entre *Chlamydia abortus* y *psittaci* y espermatozoides de toros reproductores. Los resultados demostraron que solo las *Chlamydias* viables de ambas especies disminuyeron la motilidad total y progresiva de los espermatozoides, después de aproximadamente 9 horas de incubación. Además, observaron mediante microscopía óptica que solo *C. abortus* y *C. psittaci* viables eran capaces de unirse a los espermatozoides bovinos y que esa unión aumentaba de manera dependiente con el tiempo, siendo capaces de afectar la motilidad de los espermatozoides bovinos. Esto podría indicar que en nuestras muestras de semen bovino criopreservado la viabilidad de las *Chlamydias spp.* no era la adecuada como para afectar los parámetros de calidad seminal, sumado al hecho que el tiempo máximo al que se evaluó esto fue a las dos horas post-descongelación.

En nuestro trabajo pudimos observar que la MET y la MRP fueron afectadas negativamente solo en las muestras en las que se amplificó los genes correspondientes a *U. diversum*. En concordancia con nuestros hallazgos, Lui *et al.* (2014) estudiaron la prevalencia de infecciones generadas por *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Chlamydia trachomatis* y su efecto sobre la calidad seminal en hombres infértiles y fértiles. Observaron

que, si bien los tres microorganismos mostraban una elevada frecuencia entre hombres infértiles y fértiles, solo *Ureaplasma* fue capaz de influir negativamente en los parámetros de calidad seminal (morfología, vitalidad, motilidad e integridad celular). Los autores adjudicaron este efecto a la capacidad de *Ureaplasma* de adherirse a los espermatozoides. En función de los parámetros de calidad seminal evaluados en nuestro trabajo no se detectaron cambios o alteraciones ocasionadas por la presencia del material genético correspondiente a los demás agentes estudiados. Esto podría deberse a que solo detectamos la presencia/ausencia de los microorganismos estudiados y no la cuantificación de ADN, por lo que probablemente la concentración de material genético correspondiente a *M. bovis genitalium*, *M. californicum*, *Chlamydia spp.* en el semen no fue suficiente para afectar la calidad seminal. En coincidencia con esto, Flores-Olivares *et al.* (2014) reportaron que la presencia de *E. coli* fue capaz de afectar negativamente la calidad de los espermatozoides eyaculados en carneros y este efecto fue dependiente de la concentración bacteriana. A pesar que estos microorganismos son patógenos oportunistas, no hemos encontrado reportes que indiquen que el uso de semen contaminado haya tenido impacto negativo sobre las tasas de concepción o preñez en vacas inseminadas. Esto pone en duda la patogenicidad de estos agentes, siendo necesario generar estudios que evalúen su capacidad de provocar enfermedad. Como consecuencia de ello, podríamos considerar que el toro actúa como un portador sano con capacidad para diseminar los genes correspondientes a estos agentes estudiados.

9. CONCLUSIONES

- ✓ Las técnicas de PCR permiten detectar la presencia de genes correspondientes a *M. californicum*, *M. bovis genitalium*, *Chlamydia spp.* (genes 23S y 16S) y *U. diversum* en muestras de semen de bovino criopreservado de origen comercial. No se detectó la presencia de la secuencia génica correspondiente a *Mycoplasma bovis* en las muestras estudiadas.
- ✓ La prevalencia de los genes codificantes para los agentes evaluados en muestras de semen bovino criopreservado fue de 41% para *Mycoplasma californicum*, 22% para *Mycoplasma bovis genitalium*, 11% para *Ureaplasma diversum*, 47% para *Chlamydia spp.* 23S y un 7% para *Chlamydia spp.* 16S.

- ✓ En el 25% de los toros afectados se detectó la presencia de genes correspondientes a más de un microorganismo estudiado.
- ✓ Solo la presencia del material genético correspondiente a *U. diversum* afectó negativamente los parámetros de calidad seminal evaluados en las muestras de semen bovino criopreservado de origen comercial.

10. ANEXO

TINCIÓN VITAL EOSINA NIGROSINA

Citrato de sodio dihidratado.....	2,45 g
Nigrosina.....	2 g
Eosina.....	1 g
Agua bidestilada estéril.....	100 ml

SOLUCIÓN HOS

(Según Paulenz, 1992)

Citrato de Sodio.....	0,49 g
Sodium citrate® MALLINCKRODT 0754	
Fructosa.....	0,90 g
D-(+)-Fructose® SIGMA F3510	
Agua pura c.s.p.....	100 ml
Bamstead/Ultraline®, modelo D 11931 (USA)	

Nota: Ajustar la osmolaridad a 100 mOsm/l pH a 7,5-7,8 (ajustar adicionando hidróxido de sodio (Sodium hydroxide® SIGMA S5881). Alicuotar en botellas con tapa a razón de 50 ml c/u y conservar en heladera a 5 ° C hasta su uso.

SOLUCIÓN HOS FORMOL (STOP)

Solución HOS.....	1 ml
Solución formol al 38%.....	3 µl
Formaldehyde solution® SIGMA F8775	

Nota: Conservar a 5 ° C hasta su uso.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Althouse, GC; Lu, KG. 2005. Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriogenology* 63:573-584.
- Amram, E; Freed, M; Khateb, N; Mikula, I; Blum, S; Spargser, J; Sharir, B; Ozeri, R; Harrus, S; Lysnyansky, I. 2013. Multiple locus variable number tandem repeat analysis of *Mycoplasma bovis* isolated from local and imported cattle. *The Veterinary Journal*. 197(2):286-290.
- Aponte, PM; De Rooij, CG; Bastidas, P. 2005. Testicular development in Brahman bulls. *Theriogenology*. 64(6):1440-55.
- Auroux, MR; Jacques, L; Mathieu, D; Auer, J. 1991. Is the sperm bacterial ratio a determining factor in impairment of sperm motility: an *in-vitro* study in man with *Escherichia coli*. *Int J Androl*. 14:264-270.
- Ball, HJ; Logan, EF; Orr, W. 1987. Isolation of *Mycoplasmas* from bovine semen in Northern Ireland. *Vet. Rec.* 121(14):322-324.
- Barbas, JP; Mascarenhas, RD. 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank*. 10:49-62.
- Bayramova, F; Jacquier, N; Greub, G. 2018. Información sobre la biología de las bacterias relacionadas con *Chlamydia*. 20(7-8):432-440.
- Berndston, WE; Desjardins, C. 1974. The cycle of the seminiferous epithelium and spermatogenesis in the bovine testis. *Am J Anat*. 140(2):167-79.
- Bolarín-Guillén, A. 2011: Bacteriología en semen porcino. *Av. Tecnol. Porc*. 5(9):20-30.
- Borel, N; Thoma, R; Spaeni, P; Weilenmann, R; Teankum, K; Brugnera, E; Zimmermann, D. R; Vaughan, L; Pospischil, A. 2008. *Chlamydia*-related abortions in cattle from Graubunden, Switzerland. *Veterinary Pathology*. 43(5):702-708.
- Beer, K.; Dürrling, H; Pfützner, H. 1986. Manifestation of *Mycoplasma californicum* in cattle organs. *Arch. Exp. Veterinary med*. 40(1):63-66.
- Bronwyn-Crane, MB; Hughes, CA. 2018. ¿Se puede transmitir *Ureaplasma diversum* de donante a receptor a través del embrión? Dos informes de casos que describen las pérdidas de *U. diversum* en embarazos de embriones bovinos. *Canad Vet J*. 59(1):43-46.

- Buzinhani, M; Yamaguti, M; Oliveira, RC; Cortez, BA; Marques, LM; Machado-Santelli GM; Assumpção, MEO; Timenetsky, J. 2011. Invasión de *Ureaplasma diversum* en espermatozoides bovinos. BMC Research Notes. 4(455):2-8.
- CABIA (Cámara Argentina de Biotecnología de la Reproducción e Inseminación Artificial). 2020. Movimiento anual de dosis de semen bovino. Año 2020 (en línea, sitio web). Consultado 20 mayo 2021. Disponible en <https://forodegeneticabovina.com.ar/oferta-de-genetica-en-argentina/semen-cabia/>
- Calvinho, LF; Neder, V. 2013. Infecciones resistentes en el tambo. *Mycoplasmas* en el rodeo lechero. Medicina Veterinaria. 21(263):18-22.
- Campero, C. 2000. Las enfermedades reproductivas en los bovinos: ayer y hoy. Revista de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria de Argentina. 53(2): 88-112.
- Carpio-Chuchuca, SV; Garnica, P. 2015. Evaluación de dos diluyentes para la conservación de semen bovino: yema de huevo vs leche descremada. Médico Veterinario Zootecnista. Cuenca. Ecuador. Universidad Politécnica Salesiana. 19-20.
- Catena, W; Cabodevila, J. 1999. Evaluación de semen bovino congelado. Taurus. 1(3):18-31.
- Cerdá, R; Xavier, J; Sansalone, P; De la Sota, R; Rosenbush, R. 2000. Aislamiento de *Mycoplasma bovis* durante un brote de mastitis bovina en una lechería de la provincia de Buenos Aires. 1er informe en la República Argentina. Rev Latinoam Microbiology. 42(1):7-11.
- Córdova-Izquierdo, A; Rui-Lang, CG; Xolalpa-Campos, V; Córdova-Jiménez, MS; Córdova-Jiménez, CA. 2011. Animal biotechnologies play with possibility of implementation to optimize the reproductive and productive potential of animals. Revista Complutense de Ciencias Veterinarias. 5(2):1-10.
- Datta, U; Bandopadhyay, SK; Hembram, ML. 2014. Structural modification of the black bengal buck (*Capra hircus*) acrosome during post-testicular maturation of spermatozoa. Int. J. Morphol. 32(4):1502-1508.
- Di Rienzo JA; Casanoves F; Balzarini MG; Gonzalez L; Tablada M; Robledo CW. InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

- Doig, PA. 1981. Micoplasmosis genital bovina. *Can Vet J.* 22(11):339-343.
- Eaglesome, MD; García, MM. 1997. Disease risks to animal health from artificial insemination with bovine semen. *Sci Technology.* 16(1):215-225.
- Eckert, T; Goericke-Pesch, S; Heydel, C; Bergmann, M; Kauffold, J; Failing, K; Wehrend, A. 2019. Interacción de diferentes especies de *Chlamydiae* con espermatozoides bovinos. *Microbiología de BMC.* 19(1):23.
- Erno, H; Blom, E. 1972. Mycoplasmosis: experimental and spontaneous infections of the genital tract of bulls. *Acta Vet Scand.* 13(2):161-74.
- Everett, KD; Bush, RM; Andersen, AA. 1999. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int J Syst Bacteriol.* 49(2):415-40.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2021. Programas y proyectos (en línea, sitio web). Consultado 20 mayo 2021. Disponible en <https://www.fao.org/cuba/programas-y-proyectos/historias-de-exito/proyecto-porcino/ar/>
- Ferré, LB; Malika, G; Aller, JF; Alberio, H; Fresno, C; Kjellandc, M. 2015. Llama (*Lama glama*) semen collection via thermo-electric artificial vagina: Effect of seasonality and collection interval on ejaculate characteristics. *Small Rumin Res.* 133:140-147.
- Fish, NA; Rosendal, S; Miller, RB. 1985. The Distribution of *Mycoplasma* and *Ureaplasma* in the genital tract of normal artificial insemination bulls. *Canadian Veterinary Journal.* 26(1):13-15.
- Flores-Olivares, CA; Fiorentino, MA; Cano, A; Louge, E; Moreira, AR; Ramírez-Vasquez, RA; Manes, J. 2014. Effects of *Escherichia coli* isolated from cases of vaginitis on ram sperm quality. 2° Simp. Lat. Rep. Anim. 13-14 de noviembre, Santiago, Chile.
- García, A. 2013. *Microbiología Veterinaria II: Bacterias inferiores.* Primera edición. Managua, Nicaragua. Universidad Nacional Agraria. 118-119.
- Gonzalez, RM; Sears, PM; Merrill, RA. 1992. Mastitis due to *Mycoplasma* in the state of New York during the period of 1972-1990. *Cornell Vet.* 82(1): 29-40.

- Haapala, V; Pohjanvirta, T; Vähänikkilä, N; Halkilahti, J; Simonen, H; Pelkonen, S; Soveri, T; Simojoki, H; Autio, T. 2018. Semen as a source of *Mycoplasma bovis* mastitis in dairy herds. *Veterinary Microbiology*, 216:60-66.
- Hare, WCD. 1985. Enfermedades transmisibles por el semen y las técnicas de transferencia de embriones. *CADIA*. 1(4):8-26.
- Hartman, HA; Tourtellotte, ME, Nielsen, SW; Plastringe, WN. 1964. Experimental bovine uterine mycoplasmosis. *Res. Vet. Sci.* 5:303-313.
- Hermes, R; Hildebrandt, TB; Göritz, F; Fasel, NJ; Holtze, S. 2019 First cryopreservation of phyllostomid bat sperm. *Theriogenology*. 131:28-31.
- Hobson, N; Chousalkar, KK; Chenoweth, PJ. 2013. *Ureaplasma diversum* en semen de toro en Australia: su detección y posibles efectos. *Aust Vet J.* 91:469–73.
- Hotzel, H; Sachse, K; Pfutzner, H; Demuth, B; Pflitsch, A. 1993. Detection of *Mycoplasma bovis* using in vitro deoxyribonucleic acid amplification. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 12:581-591.
- Hutchinson, LJ. 1996. Economic impact *Paratuberculosis*. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 12(2):373-381.
- James, G. 2010. Universal Bacterial Identification by PCR and DNA Sequencing of 16S rRNA Gene. Schuller, M; Sloots, T; James, G; Halliday, C; Carter, I. Eds *PCR for Clinical Microbiology*. Springer, Dordrecht.
- Jasper de Erno, H; Dellinger, JD; Christiansen, C. 1981. *Mycoplasma californicum*, una nueva especie en las vacas. *Revista Internacional de Bacteriología Sistemática*. 31:339-345.
- Jeyendran, R.S; Van der Ven, H. H; Perez-Pelaez, M; Crabo, B. G; Zaneveld, L. J. D. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*, 70(1):219-228.
- Jurmanova, K; Sterbova, J. 1977. Correlation between impaired spermatozoa motility and mycoplasma findings in bull semen. *Vet. Rec.* 100:157-158.
- Junjie, L; Quanxian, W; Xiaofei, J; Shang, G; Yanpeng, D; Zhan, Z; Liting, J; Ying, S; Shuhong, T; Yushan, L. 2014. Prevalence of *Ureaplasma Urealyticum*, *Mycoplasma*

Hominis, Chlamydia Trachomatis infections, and semen quality in infertile and fertile men in China. *Urology*. 83(4):795-799.

- Kaltenboeck, B; Hehnen, HR; Vaglenov, A. 2005. Bovine *Chlamydophila spp.* infection: Do we underestimate the impact on fertility? *Vet. Res. Comun*, 29:1-15.
- Kauffold, J; Henning, K; Bachmanna, R; Hotzel, H; Melzer, F. 2007. The prevalence of Chlamydiae of bulls from six bull studs in Germany. *Animal Reproduction Science*. 102:111-121.
- Kemmerling, K; Muller, U; Mielenz, M; Sauerwein, H. 2009. *Chlamydophila* species in dairy farms: Polymerase chain reaction prevalence, disease association, and risk factors identified in a cross-sectional study in western Germany. *Journal of Dairy Science*. 92(9):4347-4354.
- Kobayashi, H; Hirose, K; Worarach, A; Paugtes, P; Ito, N; Morozumi, T; Yamamoto, K. 1998. *In vitro* amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma alkalescens* and *Mycoplasma bovis* by PCR. *J Vet. Met.* 60(12):1299-1303.
- Le Grand, D; Poumarat, F; Martel, J. 1995. Enfermedad genital infecciosa por *Ureaplasma diversum*: investigaciones sobre bovinos en Francia. *Vet. Res.* 26:11-20.
- Londra, T; Alustiza, F; Manes, J. 2021. Microbiología del semen bovino: efectos sobre la calidad seminal. Licenciatura en Genética. Pergamino, Buenos Aires. Argentina. Universidad Nacional del Noroeste de la provincia de Buenos Aires. 53-57.
- Longbottom, D; Coulter, LJ. 2003. Animal *Clamydioses* and zoonotic implications. *Journal of Comparative Pathology*. 128(4):217-144.
- Lozano H. 2009. Factores que afectan la calidad seminal en toros. *Revista Médica Veterinaria y de Zootecnia*. 56(3):258-272.
- Mackie, DP; Ball, HJ; Logan, EF. 1986. Mastitis por *Mycoplasma californicum* en la vaca lechera seca. *Vet. Reg.* 119:350-351
- Marques, LM; Buzinhani, M; Neto, RL; Oliveira, RC; Yamaguti, M; Guimarães, AM; Timenetsky, J. 2009. Detection of *Ureaplasma diversum* in bovine semen straws for artificial insemination. *British Veterinary Association*. 165(19):572-573.
- Marques, LM; Guimarães, AMS; Martins, HB; Rezende, IS; Barbosa, MS; Campos, GB; Do Nascimento, NC; Dos Santos, AP; Amorim, AT; Santos, VM; Messick, JB; Timenetsky

- J. 2015. Genome sequence of *Ureaplasma diversum* strain ATCC 49782. *Genome Announc.* 3(2):314-15.
- Mazurova, J; Krpatova, J. 1990. The risks of the cryopreservation of bull semen. *Veterinarstvi* 40:402-404.
- Mortimer D. 1994. *Practical Laboratory Andrology* (Hardcover). New York. EE.UU. Oxford University Press. 159-174.
- Neder, VE; Allassia, M; Amadio, A; Calvinho, LF. 2019. First report of *Mycoplasma leachii* isolation associated with disease in dairy calves in Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 51(1):18-21.
- Neres-Santos-Junior, M; Macedo-Neres, NS; Barreto-Campos, G; Lopes-Bastos, B; Timenetsky, J; Marques, ML. 2021. A Review of *Ureaplasma diversum*: A Representative of the *Mollicute* Class Associated With Reproductive and Respiratory Disorders in Cattle. 8:1-19.
- OIE (Oficina Internacional de Epizootias). 1996. *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines*. Third edition. ISBN 92-9044-423-1.
- Ordoñez, HCO; Tamargo-Miguel, C; Diez-Monforte, C. 2005. Análisis del semen bovino. *Tecnología Agroalimentaria.* (2):39-43.
- Palma, G.A. 2008. *Biología de la Reproducción*. Segunda Edición. *Biología de la reproducción ciencia, tecnología y sociedad*. Santiago del Estero. Argentina. Rebiotec. 1-49.
- Paolilli, MC; Cabrini, SM; Pagliaricci, LO; Fillat, FA; Bitar, MV. 2019. Estructura de la carne bovina Argentina. *Producción Argentina.* 10(40):51-56.
- Parker, AM; House, JK; Hazelton, MS; Bosward, KL; Sheehy, PA. 2017. Comparison of culture and a multiplex probe PCR for identifying *Mycoplasma* species in bovine milk, semen and swab samples. *Plos One.* 12(3):1-14.
- Parker, AM; Sheehy, PA; Hazelton, MS; Bosward, KL; House, KL. 2018. A review of *Mycoplasma* diagnostics in cattle. *Vet Intern Med.* 32:1241-1252.
- Parkinson, TJ. 2019. Specific Infectious Diseases Causing Infertility and Subfertility in Cattle. *Veterinary Reproduction and Obstetrics.* 10:434-466.

- Patel, HV; Patel, RK; Chauhan, JB. 2012. Biochemical properties of microbial load in frozen semen of cattle. *Wayamba J Anim Sci.* 3:117-121.
- Piasecka-Serafin, M. 1972. The effect of the sediment accumulated in containers under experimental conditions on the infection of semen stored directly in liquid nitrogen (-196°C). *Bull Acad Pol Sci Biol.* 20:263-267.
- Pineda, Y; Santander, J. 2007. Evaluación de la flora bacteriana del semen de verracos en granjas porcinas de Venezuela. *Zootecnia Tropical.* 25(3):173-177.
- Pohjanvirta, T; Vähänikkilä, N; Simonen, H; Pelkonen, S; Autio, T. 2020. Eficacia de dos combinaciones de extensores de antibióticos sobre *Mycoplasma bovis* en la producción de semen bovino. *Pathogens.* 9 (10):808.
- Puerta-Suárez, J; Villegas-Castaño, A; Serna-Quintana, GJ; Martínez, A; Romero-Palacio, J; Giraldo, M; Cadavid, A; Cardona-Maya, W. 2015. Espermocultivo: crecimiento bacteriano del eyaculado y su relación con los parámetros seminales. *Revista chilena de obstetricia y ginecología,* 80(1):33-40.
- Rasit-Ugur, M; Saber-Abdelrahman, A; Evans, HC; Gilmore, AA; Hitit, M; Arifiantini, R; Purwantara, B; Kaya, A; Memili, E. 2019. Avances en la criopreservación de espermatozoides de toro. *Front Vet Sci.* 6:268.
- Rearte, D. 2011. Situación actual y prospectiva de la ganadería argentina, un enfoque regional. *Sitio Argentino de Producción Animal.* 19(3-4):46-49.
- Reinhold, P; Sachse, K; Kaltenboeck, B. 2011. ¿*Chlamydiaceae* in cattle: commensals, trigger organisms, or pathogens? *Journal of Veterinary Research.* 189(3):257-267.
- Rodolakis, A; Laroucau, K. 2015. *Chlamydiaceae* and chlamydial infections in sheep or goats. *Vet Microbiol.* 181(1-2):107-18.
- Rodríguez, M; Vallejo, A; Batista, P; Espasandin, AC. 2011. Biotecnologías reproductivas aplicadas a la mejora genética animal Marcela. *Cangüe Digital.* 31: 44-50.
- Rojas, M. 2014. Avances sobre el conocimiento en *Chlamydia* en los rodeos bovinos de la provincia de La Pampa. *Avances en investigación en Salud Pública Veterinaria en la provincia de la Pampa.* Anguil, La Pampa. Argentina. Editorial INTA Anguil. 21-23.
- Rojas, MC; Fort, M; Bettermann, S; Entrocassi, C; Costamagna, SR; Sachse, K; Rodríguez Fermepin, M. 2018. Detección de *Chlamydia abortus* en pérdidas reproductivas de

- bovinos en la provincia de La Pampa, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*. 50(3):269-274.
- Ronald, BSM; Prabhakar, TG. 2001. Bacterial analysis of semen and their antibiogram. *Ind. J. Anim. Sciences* 71:829-831.
- Rosengarten, R; Citti, C; Much, P; Spergser, J; Drosesse, M; Hewicker-Trautwein, M. 2001. The changing image of *Mycoplasmas*: from innocent bystanders to emerging and reemerging pathogens in human and animal diseases. *Contrib Microbiolob.* 8:166-185.
- Sachse, K; Bavoil, PM; Kaltenboeck, B; Stephens, RS; Kuo, C; Rosselló-Móra, R; Horn, M. 2014. Emendation of the family *Chlamydiaceae*: Proposal of a single genus, *Chlamydia*, to include all currently recognized species. *Systematic and Applied Microbiology*. 38(2):99-103.
- Santis, G; Evans, TW. 1999. Molecular biology for the critical care physician. *Crit Care Med*. 27(4):997-1004.
- Schautteet, K; Vanrompay, D. 2011. *Chlamydiaceae* infections in pig. *Veterinary Research*. 42(1):29.
- SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). 2021. Cadena animal-Bovinos y Bubalinos-Estadísticas (en línea, sitio web. Consultado 20 mayo 2021. Disponible en <https://www.argentina.gob.ar/senasa/mercados-y-estadisticas/estadisticas/animal-estadisticas/bovinos>
- SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). 2008. Programa de Control y Erradicación de las Enfermedades venéreas en Bovinos de la Provincia de La Pampa (Resolución 358/2008). Consultado 20 mayo 2021. Disponible en <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/140000-144999/141098/norma.htm>
- Smith, A; Chousalkar, KK; Chenoweth, PC. 2012. Polymerase chain reaction for detection of *Ureaplasma diversum* from urogenital swabs in cattle in Australia. *Aust Vet J*. 90:275-276.
- Sosa, C; Tirante, L; Chaves, J; Pol, M; Ambrogi, A; Angel Giraud, J; Tamiozzo, P. 2018. Identificación de especies de *Mycoplasma* y de *Ureaplasma diversum* en rodeos lecheros de Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*. 50(1):31-35.

- Kissi, B; Juhász, S; Stipkovits, L. 1985. Effect of *Mycoplasma* contamination of bull semen on fertilization. Acta Vet. Hung. 33,107-117.
- Tamay De Dios, L; Ibarra, C; Velasquillo, C. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Tecnología en Salud. 2(2):70-78.
- Tang, J; Hu, M; Lee, S; Roblin, R. 2000. Un método basado en la reacción en cadena de la polimerasa para detectar contaminantes de *Mycoplasma/Acholeplasma* en cultivos celulares. Métodos J Microbiol. 39:121-126.
- Thibier, M. 1990. New biotechnologies in cattle reproduction. 7th Congress of the Federation of Asian Veterinary Associations (FAVA). Royal Thai Veterinary Medical Association. Bangkok. Thailand. Chulalongkorn Univ. 512-524
- Thibier, M; Guerin, B. 2000. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. Animal Reproduction Science. 62(1-3):233-251.
- Thibier, M; Wagner, HG. 2002. World statistics for artificial insemination in cattle. Livest Prod. Sci. 74:203-212.
- Thoen, CO; Himes, EM; Stumpff, CD; Parks, TW; Sturkie, HN. 1977. Isolation of *Mycobacterium bovis* from prepuce of a herd bull. Journal of Veterinary Research. 38(6):877-878.
- Thomas, A; Dizier, I; Linden, A; Mainil, J; Frey, J; Vilei, EM. 2004. Conservation of the uvrC gene sequence in *Mycoplasma bovis* and its use in routine PCR diagnosis. The Veterinary Journal. 168:100–102.
- Tourtellotte, ME; Lein DH. 1976. Infertilidad del ganado bovino causada por micoplasmas. Health Lab Sci. 13(2):152-158.
- Trautwein, MH; Feldmann, M; Kehler, W; Schmidt, R; Thiede, S; Seeliger, F; Wohlsein, P; Ball, HJ; Buchenau, I; Spargser, J; Rosengarten, R. 2002. Outbreak of pneumonia and arthritis in beef calves associated with *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma californicum*. Veterinary Record. 151:699-703.
- Vasconcellos-Cardoso, M; Blanchard, A; Ferris, S; Verlengia, R; Timenetsky, J. Florio Da Cunha, RA. 2000. Detection of *Ureaplasma diversum* in cattle using a newly developed PCR-based detection assay. Veterinary Microbiology. 72:241-250.
- Wierzbowski, S. 1981. Bull semen opportunistic pathogen and ubiquitous microflora. Revista Documentos de la FAO sobre producción y sanidad animal (FAO). 23,26-28.

Williams, S. 2013. Swine semen cryopreservation: challenges and perspectives. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 37(2):207-212.

Yang, S; Rothman, RE. 2004. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *Infectious Diseases.* 4:337-48.