

CAPÍTULO 3.6.2.

METRITIS CONTAGIOSA EQUINA

RESUMEN

Descripción e importancia de la enfermedad: La metritis equina contagiosa es una enfermedad inflamatoria de las partes proximal y distal del tracto reproductor de las yeguas causada por *Taylorella equigenitalis*, que normalmente origina una infertilidad temporal. Se trata de una infección no sistémica, cuyos efectos se encuentran restringidos al tracto reproductivo de la yegua.

Cuando aparecen, los signos clínicos consisten en endometritis, inflamación del cuello del útero y vaginitis de intensidad variable, y una ligera a copiosa secreción vaginal mucopurulenta. La recuperación tiene lugar sin secuelas, aunque, en un gran número de las yeguas infectadas, se establece un estado duradero de portador asintomático o sintomático. El contacto venéreo directo durante la monta natural comporta el máximo riesgo de transmisión de *T. equigenitalis* de un semental contaminado o una yegua infectada. La transmisión venérea directa también puede tener lugar mediante la inseminación artificial en la que se emplee esperma infectado crudo, refrigerado y también posiblemente congelado. Indirectamente, el animal puede contraer la infección por transmisión por fómites, contaminación manual, insuficiente cumplimiento de las medidas de bioseguridad en el momento de la reproducción y en los centros de recogida de esperma. Los sementales pueden convertirse en portadores asintomáticos de *T. equigenitalis*. Los principales puntos de colonización por parte de la bacteria son las mucosas urogenitales (fosa uretral, seno uretral, uretra terminal y prepucio). Los puntos de persistencia de *T. equigenitalis* en la mayoría de yeguas portadoras son los senos y la fosa del clítoris, y de manera infrecuente, el útero. Los potros nacidos de yeguas portadoras también pueden convertirse en portadores. El microorganismo puede infectar a especies de équidos distintas de los caballos, como los asnos.

Detección e identificación del agente: Deben tomarse hisopos de las localizaciones designadas en los genitales. Para la identificación del agente debe utilizarse reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR) o cultivo. Para evitar la pérdida de viabilidad para el cultivo, deben sumergirse por completo hisopos individuales en un medio de transporte Amies con carbón y transportarse al laboratorio en condiciones de temperatura controlada, para su resiembra en un plazo de 48 horas tras la recogida. Es probable que el crecimiento de *T. equigenitalis* lleve 3–6 días a 37°C en medios especializados y en una atmósfera del 5–10% de CO₂. Es aconsejable realizar una incubación de al menos 7 días antes de certificar que los cultivos son negativos para *T. equigenitalis*. La identificación debe incluir la caracterización bioquímica, el análisis antigénico empleando anticuerpos específicos y la genotipificación molecular. También existen dos PCR en tiempo real para la prueba de identificación del agente y tienen algunas ventajas respecto al cultivo. Los hisopos para la PCR en tiempo real no tienen que insertarse en medio de transporte bacteriano. Existen otras PCR y se han desarrollado otras pruebas de detección, como la prueba de la inmunofluorescencia indirecta, y, por último, se han sometido sementales a reproducción para comprobar si eran portadores, a modo de complemento de las pruebas de identificación del agente.

Pruebas serológicas: La serología ha sido de gran utilidad para detectar infecciones recientes, aunque no crónicas, en las yeguas. Pueden detectarse anticuerpos séricos contra *T. equigenitalis* en las yeguas durante 3–7 semanas tras la infección. También se pueden poner de manifiesto en las ocasionales yeguas portadoras, pero nunca en el semental. Ninguna prueba serológica descrita hasta la fecha sirve por sí sola para detectar de forma fiable la infección. Las pruebas serológicas pueden utilizarse como ayuda al cultivo de *T. equigenitalis* en la identificación de yeguas que hayan copulado recientemente con un semental portador, pero no pueden utilizarse como sustitutivo del cultivo del microorganismo.

Requisitos para las vacunas: Todavía no se dispone de ninguna vacuna eficaz.

A. INTRODUCCIÓN

1. Descripción e impacto de la enfermedad

La metritis equina contagiosa se describió por primera vez en el Reino Unido (RU) en 1977, y después se diagnosticó en varios países de todo el mundo. Se presentó por primera vez como un brote de una enfermedad caracterizada por una secreción vaginal mucopurulenta causada por una inflamación del endometrio y el cuello del útero, y que provocaba una infertilidad temporal. Las yeguas pueden padecer más de un episodio de la enfermedad en un corto espacio de tiempo. La mayoría de las yeguas se recuperan sin problemas, pero algunas pueden convertirse en portadoras del microorganismo causal, *Taylorella equigenitalis*, durante muchos meses. La infección no siempre afecta negativamente a la concepción y el aborto debido a *T. equigenitalis* es muy infrecuente. Muchos casos primarios son subclínicos, y un indicador frecuente de la infección consiste en que la yegua entra en estro prematuramente después de haber copulado con un semental posible portador. La infección de los sementales es asintomática.

El estado de portador desempeña un papel importante en la diseminación de la bacteria. Las membranas urogenitales del semental se contaminan durante el coito o por contacto con los fómites que se utilicen para la obtención del esperma, y el estado de portador puede persistir durante muchos meses o años. La mayoría de las yeguas portadoras son portadoras a nivel del clítoris, de tal forma que unas medidas higiénicas deficientes durante la monta también pueden propagar el microorganismo. La infección previas no son totalmente protectoras ya que los anticuerpos séricos solo persisten unas pocas semanas después de la infección, por lo que el control de la infección se ha basado únicamente en la prevención de la transmisión. El microorganismo puede eliminarse mediante un tratamiento con antibióticos combinado con un lavado y enjuagado antiséptico de los sitios afectados. Por lo que se sabe, *Taylorella equigenitalis* no infecta al ser humano y debe manejarse en el laboratorio con los procedimientos adecuados de bioseguridad y bioprotección, que vendrán determinados por un análisis del riesgo biológico (véase el Capítulo 1.1.4 *Bioseguridad y bioprotección: norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales*).

2. Naturaleza y clasificación del agente patógeno

Taylorella equigenitalis es un bacilo o coco-bacilo gramnegativo inmóvil que a menudo es pleomórfico (mide hasta 6 µm de largo) y que puede presentar tinción bipolar. Es catalasa positivo, fosfatasa positivo y fuertemente oxidasa positivo. Por lo demás, es inerte en las pruebas de actividad bioquímica.

3. Diagnóstico diferencial

El microorganismo, de crecimiento exigente y lento, puede aislarse en el laboratorio a partir de hisopos de sitios de colonización en el tracto reproductivo de sementales y yeguas (fosa uretral, seno uretral, uretra terminal, vaina peneana, fosa del clítoris, senos del clítoris y endometrio) utilizando las condiciones atmosféricas correctas, y actualmente es el procedimiento preferido para el comercio o desplazamiento de animales a nivel internacional. Para los desplazamientos internacionales, los lugares de los que deben tomarse los hisopos para las pruebas descritas suelen establecerlos las autoridades competentes.

Actualmente se utilizan con frecuencia métodos moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y especialmente la PCR en tiempo real para detectar *Taylorella* tanto de hisopos como en placas de cultivo. Tienen la ventaja de la rapidez de los resultados y habitualmente permiten diferenciar entre *T. equigenitalis* y *T. asinigenitalis*.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la metritis contagiosa equina y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Comprobar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Identificación e identificación del agente						
Aislamiento e identificación de la bacteria	+++	+++	+++	+++	+++	–
IFAT	+	+	+	+	+	–
PCR en tiempo real	+++	+++	+++	+++	+++	–

Clave: +++ = método recomendado para este propósito; ++ = método recomendado pero tiene limitaciones; + = método adecuado en muy pocas situaciones; – = no adecuado para este propósito
IFAT = prueba de inmunofluorescencia indirecta; PCR = reacción en cadena de la polimerasa.

1. Detección e identificación del agente patógeno

1.1. Técnicas de cultivo

Debe prestarse especial atención a la obtención de muestras y al transporte antes del aislamiento e identificación de *Taylorella*. Los hisopos deben depositarse en un medio de transporte con carbón activado, como el medio de Amies, para absorber los subproductos inhibidores del metabolismo bacteriano (Swerczek, 1978). Con el tiempo el número de *T. equigenitalis* de los hisopos disminuye, y este efecto es más acusado a temperaturas elevadas (Sahu et al., 1979). Los hisopos deben mantenerse refrigerados durante el transporte y deben llegar al laboratorio y sembrarse en placas como máximo 48 horas después de su recogida.

Existen diversas bacterias en las membranas urogenitales de los caballos como comensales inofensivos que pueden interferir con el cultivo de *T. equigenitalis* enmascarando su presencia. El lavado y el tratamiento con antibióticos pueden controlar este problema, pero pueden dañar de forma subletal a *T. equigenitalis*, lo cual le permitirá persistir en las membranas urogenitales pero imposibilitará su crecimiento en medios de laboratorio. El hisopado de *T. equigenitalis*, por lo tanto, no debe reiniciarse hasta al menos 7 días (tratamiento sistémico) o 21 días (tratamiento local) después del tratamiento.

La naturaleza exigente de *T. equigenitalis* hace que sea difícil de aislar. La reproducción de prueba de los sementales se ha utilizado para aumentar la sensibilidad de la detección de portadores y ha sido un complemento valioso para el examen mediante cultivos. Las cantidades de *Taylorella* presentes en los genitales externos de los sementales pueden ser muy bajas y pueden pasar desapercibidas con el mero cultivo, pero se pueden detectar después de la multiplicación en la yegua con la que se haya llevado a cabo la reproducción de prueba. El uso de la reproducción de prueba como herramienta de diagnóstico adicional puede ser especialmente importante en países que se consideren libres de metritis equina contagiosa.

Los medios de cultivo se producen calentando la base de agar reconstituida que contiene sangre de caballo lisada al 5% (v/v) a 70–80°C durante 12 minutos (agar sangre de chocolate), que se enfría a 45–50°C y a la que se añade trimetoprim (1 µg/ml), clindamicina (5 µg/ml) y anfotericina B (5–15 µg/ml) (Timoney & Powell, 1982). La sangre del caballo lisada contiene timidina fosforilasa, que inactivará la timidina, permitiendo así que el trimetoprim ejerza su efecto selectivo. Este es el medio preferido para aislar *T. equigenitalis*, por lo que cada hisopo debe ser inoculado en este medio. Aislará con éxito los biotipos del patógeno tanto sensibles como los resistentes a la estreptomycin; inhibirá el crecimiento

de muchas bacterias comensales e inhibirá el crecimiento de hongos. Como los inhibidores pueden evitar el aislamiento de algunas cepas de *T. equigenitalis*, los hisopos también deben inocularse en 5% de agar sangre “chocolate” con una base rica en agar peptona que contenga cisteína adicional (0,83 mM), sulfito de sodio (1,59 mM) y un fungicida (5–15 µg/ml de anfotericina B). *Taylorella equigenitalis* se puede cultivar en agar sangre, pero crecerá mejor en agar sangre “chocolate”, como se ha descrito anteriormente. Algunos fabricantes producen una base de agar peptona que favorece el crecimiento de *T. equigenitalis*. Una característica importante de todos los medios buenos para *T. equigenitalis* es la ausencia de carbohidratos fermentables. La fermentación de carbohidratos por parte de otras bacterias inhibe el crecimiento de *T. equigenitalis* (Atherton, 1983; Fernie et al., 1980). Un tercer medio que contiene sulfato de estreptomina (200 µg/ml) puede usarse para inhibir el crecimiento de otras bacterias que podrían enmascarar *T. equigenitalis* (Swerczek, 1978); sin embargo, el biotipo sensible a la estreptomina no se detectará en este medio, y solo debe usarse junto con medio sin estreptomina.

Todos los medios de cultivo deben someterse a un control de calidad y deben permitir el crecimiento del microorganismo sospechoso a partir de un inóculo pequeño antes de utilizarse en muestras sospechosas. La cepa de referencia de *T. equigenitalis* también debe cultivarse en paralelo con las muestras problema para asegurar que las condiciones del cultivo son óptimas para el aislamiento del microorganismo.

La naturaleza exigente de *T. equigenitalis* dificulta su aislamiento. Se ha empleado la reproducción con sementales sospechosos para aumentar la sensibilidad en la detección del estado de portador como una ayuda valiosa al examen mediante los cultivos. La cantidad de *Taylorella* presente en los genitales externos de los sementales puede ser muy baja y puede perderse si solo se llevan a cabo cultivos, pero puede ser detectada después de la multiplicación en las yeguas que hayan sido sometidas a reproducción a modo de prueba. El uso de la reproducción a modo de prueba como herramienta adicional de diagnóstico puede ser especialmente importante en países que están considerados libres de la metritis equina contagiosa.

Las placas deben incubarse a 35–37°C en una atmósfera del 5–10% (v/v) de CO₂, o mediante el uso de una jarra de anaerobiosis. Normalmente, se necesitan al menos 72 horas para que las colonias de *T. equigenitalis* se hagan visibles, periodo después del cual es necesario realizar una inspección diaria. En ocasiones muy infrecuentes, la detección visual de las colonias puede llevar hasta 14 días (Ward et al., 1984). Es aconsejable un periodo estándar de incubación de al menos 7 días después para poder certificar los cultivos como negativos a *T. equigenitalis*. Debe comprobarse si las placas presentan contaminantes pasadas las primeras 24 horas de incubación. Las colonias de *T. equigenitalis* pueden medir hasta 2–3 mm de diámetro, y tener un aspecto suave y el borde entero, y ser brillantes y de color amarillo/grisáceo. Los laboratorios deben estar informados de que algunos países pueden requerir alargar el periodo de incubación como procedimiento estándar, y deben, por lo tanto, establecer los requisitos concretos de importación de esos países y/o indicar el periodo de incubación en el que se basan los hallazgos observados en los cultivos. El crecimiento de otras bacterias, como *Proteus mirabilis*, puede ser tan extenso que el laboratorio no pueda emitir un resultado negativo. En este caso, deberán solicitarse más hisopos.

Si se aísla un microorganismo de crecimiento lento que encaja con la descripción en cuanto a la morfología celular y que es oxidasa y catalasa positivo fuerte, puede analizarse para comprobar su reacción con un antisuero específico de *T. equigenitalis*.

1.2. Métodos de serotipificación

Se han diseñado varias pruebas de serotipificación para confirmar que un cultivo es *T. equigenitalis*, de varios niveles de complejidad, desde la aglutinación en porta hasta la inmunofluorescencia directa o indirecta. Cada método tiene sus ventajas e inconvenientes. El inconveniente de la prueba de aglutinación en porta es que, ocasionalmente, tiene lugar la autoaglutinación de las cepas; el cultivo en presencia de atmósfera de CO₂, contrariamente a lo que ocurre en la jarra de anaerobiosis, puede reducir la autoaglutinación (Ter Laak & Wagenaars, 1990). La inmunofluorescencia puede resultar útil para la identificación de cepas auto-aglutinantes; existe a la venta una prueba validada de inmunofluorescencia indirecta para la detección de *T. equigenitalis* en hisopos del tracto reproductivo de sementales y yeguas.

El antisuero se produce mediante la vacunación de conejos con células muertas de *T. equigenitalis*. Debe utilizarse para la inmunización una cepa estándar, como la NCTC1184¹. Sin embargo, la consideración más importante es la especificidad del antisuero producido, que debe aglutinar *T. equigenitalis*, pero no hacerlo con otras bacterias que podrían ser cultivadas a partir de las mucosas urogenitales del caballo. Concretamente, no debe aglutinar ningún bacilo gramnegativo y oxidasa positivo, como *Mannheimia haemolytica*, *Actinobacillus equuli*, *Bordetella bronchiseptica* (con la que *T. equigenitalis* se encuentra estrechamente relacionado, véase Bleumink-Pluym et al. (1993), *Oligella urethralis* y *Pseudomonas aeruginosa*. Las colonias de *Taylorella asinigenitalis* son similares, aunque no idénticas, y las características del cultivo también, y en las pruebas da resultados bioquímicos idénticos a los que se emplean para confirmar la identidad de *T. equigenitalis*. Existe incluso una reacción cruzada serológica entre los dos microorganismos. Es posible la diferenciación entre *T. asinigenitalis* y *T. equigenitalis* utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la secuenciación y la reactividad química del ADN de la subunidad 16S (Baverud et al., 2006; Breuil et al., 2011; Duquesne et al., 2007; Wakeley et al., 2006). Existen a la venta anticuerpos monoclonales que proporcionan un medio altamente específico de identificación de *T. equigenitalis*.

Existe a la venta un kit de aglutinación de látex para la identificación antigénica de *T. equigenitalis*. Se basa en anticuerpos policlonales producidos usando métodos similares a los descritos anteriormente. Se utiliza mucho en los laboratorios de pruebas de rutina para la confirmación de la identidad de las colonias que crecen en medio selectivo que dan una reacción bioquímica compatible con *T. equigenitalis*. Dado que *T. equigenitalis* es antigénicamente relativamente distinto, y pequeñas cantidades de anticuerpos de reacción cruzada se absorben fácilmente durante la producción del reactivo, la prueba ha demostrado ser muy específica y sensible. Debe destacarse que no necesariamente distinguirá las cepas de *T. equigenitalis* de las de *T. asinigenitalis*.

1.3. Inmunofluorescencia (IFAT)

Los métodos basados en anticuerpos también pueden usarse para la detección directa de *T. equigenitalis* en hisopos de muestras. Se han descrito pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFAT) tanto internas como comerciales (Breuil et al., 2010). La sensibilidad y especificidad descritas son del 93% y del 100%, respectivamente (Breuil et al., 2010). Es importante que los kits utilizados hayan sido completamente validados de acuerdo con el Capítulo 1.1.6. *Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico para las enfermedades infecciosas*. Los kits deben seleccionarse preferiblemente de entre los que figuran en el Registro de la OIE².

1.4. Espectrometría de masas con desorción/ionización láser asistida por matriz y analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS)

La espectrometría de masas con desorción/ionización láser asistida por matriz y analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS) se ha descrito como método fiable para la identificación de colonias de cultivo de *Taylorella* y para la diferenciación de *T. equigenitalis* y *T. asinigenitalis* con espectros de referencia adecuadamente ampliados empleando *spotting* directo de colonias sospechosas de 48 horas (Petry et al., 2019).

1.4. Métodos moleculares

Se han aplicado métodos de análisis moleculares como la PCR y la PCR en tiempo real a la detección de *T. equigenitalis* tanto directa (empleando hisopos tomados de puntos de muestreo) como indirectamente (de cultivos realizados a partir de hisopos). Para mitigar la posibilidad de falsos negativos, se recomienda que, siempre que sea posible, se seleccionen varias colonias sospechosas de ser del género *Taylorella* para confirmarlas por PCR. En Japón se ha evaluado la aplicación de la técnica de la PCR en el campo para la erradicación de la metritis equina contagiosa. Se demostró que la PCR fue mucho más sensible que el cultivo para la detección de *T. equigenitalis* a partir de hisopos genitales de caballos (Anzai et al., 2002; Moore et al., 2001). Se desarrolló en el Reino Unido una PCR en tiempo real para utilizarla directamente en hisopos genitales, y se comparó con los cultivos (Wakeley et al., 2006), que se ha utilizado posteriormente para estudios de detección previa a la reproducción (Ousey et al.,

1 Se puede obtener de *National Collection of Type Cultures*, Colindale, Londres, Reino Unido: <https://www.phe-culturecollections.org.uk/collections/nctc.aspx>.

2 <https://www.woah.org/es/que-ofrecemos/productos-veterinarios/>

2009). No hubo una diferencia significativa entre la realización de la PCR directa y el cultivo, pero la PCR tuvo la ventaja añadida de la rapidez del resultado y también diferenció *T. equigenitalis* de *T. asinigenitalis*. Se dispone de kits comerciales para la detección de *T. equigenitalis*, que pueden emplearse para potenciar la capacidad de análisis de los laboratorios autorizados. En la Tabla 2 se expone información sobre los cebadores y las sondas mencionados en las publicaciones sobre la detección de *T. equigenitalis* mediante PCR. Los datos de ensayos en anillo entre laboratorios también indican una mejora en la detección de *T. equigenitalis* por PCR respecto al cultivo (Mawhinney, 2020; Petry *et al.*, 2018).

1.5.1. PCR en tiempo real

Se ha desarrollado una PCR en tiempo real para utilizarla con hisopos de genitales y se ha comparado con el cultivo (Wakeley *et al.*, 2006, Mawhinney *et al.*, 2019); a continuación, se ha utilizado para el cribado previo a la reproducción (Ousey *et al.*, 2009) y para planes de vigilancia y erradicación en varios países (Belloy *et al.*, 2012; Jeoung *et al.*, 2018; May *et al.*, 2016). Se desarrolló una segunda PCR en tiempo real que se utilizó con éxito para el diagnóstico de CEM (Nadin-Davies *et al.*, 2015). Estas dos PCR en tiempo real han demostrado ser altamente específicas y reproducibles en diferentes laboratorios con una sensibilidad ligeramente superior a la del cultivo; son los ensayos de PCR recomendados.

i) PCR 1 en tiempo real (Wakeley *et al.*, 2006)

Esta PCR se ha utilizado ampliamente para la detección de MCE. Se ha demostrado que es robusta ante pequeñas modificaciones de la metodología y al aplicar diferentes técnicas de extracción de ADN cuando se valida internamente (May *et al.*, 2016; Petry *et al.*, 2018). Esta PCR en tiempo real utiliza dos PCR separadas, una que amplifica específicamente una porción del ADNr 16S de *T. equigenitalis* y *T. asinigenitalis*, y una segunda PCR de control que amplifica una región del ADNr 16S de muchas bacterias comensales que se encuentran en el tracto genital de los caballos y que actúa para confirmar la inoculación del hisopo y la extracción de ADN. Dos sondas, TEquiFAM y TAsiniHEX, correspondientes a las dos especies de *Taylorella*, están marcadas con diferentes fluoróforos para discriminar los amplicones y se utilizan en la PCR específica de *Taylorella* (Tabla 2a). En la PCR de control, se utiliza otra sonda marcada con un fluoróforo diferente para cada muestra.

La preparación de muestras de ADN de bacterias aisladas, así como de hisopos genitales, ha sido descrita por Wakeley *et al.* (2006). Las bacterias aisladas se suspenden en 1,5 ml de PBS (pH 7,4), se transfieren a tubos Eppendorf y se calientan a 95-100°C durante 20 minutos en un bloque de calentamiento, tras lo cual los tubos se centrifugan a 18.000 *g* durante 1 minuto en una microcentrífuga. Cada torunda se sumerge y se agita manualmente en 0,2 ml de PBS 0,1 M (pH 7,4) en un tubo Eppendorf de 1,5 ml durante 5 segundos; también se prepara un control de extracción negativo utilizando 0,2 ml de agua libre de nucleasas. A continuación, el tubo Eppendorf se centrifuga a 18.000 *g* en una microcentrífuga durante 30 segundos para sedimentar las bacterias. El sobrenadante se aspira y se desecha y el sedimento se vuelve a suspender en 100 µl de agua libre de nucleasas. El sedimento resuspendido se calienta a 95-100°C durante 15 minutos en un bloque térmico antes de centrifugarlo a 18.000 *g* durante 1 minuto en una microcentrífuga. Este sobrenadante es el extracto de ADN o lisado. El lisado puede utilizarse inmediatamente o conservarse a -20°C. Cada reacción utiliza 2-5 µl del lisado.

Junto a las muestras, se analizan en cada placa un *T. equigenitalis*, un *T. asinigenitalis* y un control sin plantilla. El ciclo implica una desnaturalización inicial durante 2 minutos a 94°C, seguida de 40 ciclos de amplificación de desnaturalización durante 5 segundos a 94°C, hibridación del cebador durante 10 segundos a 60°C y extensión y recogida de datos durante 15 segundos a 72°C. Una PCR en tiempo real de control para el 16S rDNA bacteriano (BactUniF, ACTA CGT-GCC-AGC-AGC-C; BactUniR, GGA-CTA-CCA-GGG-TAT-CTA-ATC-C) utilizando la sonda 16SrDNA ROX, TGT-TTG-CTC-CCC-ACG-CTT-TCG-CAC-BHQ2, se ejecuta en paralelo en un pozo separado para asegurar que el proceso de extracción y prueba ha funcionado. Las variaciones menores del método publicado, como los métodos de extracción de ADN con kits propios, las composiciones de las mezclas primarias o los controles internos, deben validarse en el laboratorio (en la empresa). La PCR se realiza en una máquina de PCR en tiempo real adecuada. Una prueba positiva tiene un valor

CT ≤ 40 para la sonda específica. Una prueba de PCR de *Taylorella* válida requiere que la PCR de ADNr 16S de control sea positiva para la muestra en cuestión.

ii) PCR 2 en tiempo real (Nadin-Davies *et al.*, 2015)

Esta PCR en tiempo real no se ha utilizado tanto, pero también es muy reproducible cuando se utiliza como se describe. El ensayo se compone de un único conjunto de cebadores con dos sondas específicas para *T. equigenitalis* (EQUI-VIC; si se dispone de HEX también se puede utilizar) y *T. asinigenitalis* (ASINI-FAM) (Tabla 2a). Una tercera sonda, HA5-CY5, TCT-ACG-AGA-GAA-CCT-CTC-CGA-GCT-CAG-CT-BHQ2, es específica de una secuencia clonada en un plásmido introducido y se utiliza como control positivo interno (IPC). El plásmido introducido contiene las secuencias del cebador TAYQ que flanquean una secuencia de 148 pb del adenovirus humano 5 correspondiente a las bases 28297 a 28407 del número de acceso M73260 del GenBank.

Para preparar la muestra problema, se extrae cada hisopo y se coloca en 1,0 ml de agua estéril libre de nucleasas en un tubo de microcentrifuga, se agita en vórtex durante 5 segundos y se deja reposar durante 5 minutos. Al mismo tiempo, se prepara también un control de extracción negativo utilizando 1,0 ml de agua libre de nucleasas. Tras el reposo en el tubo de microcentrifuga, el hisopo se devuelve a su vial original. A continuación, la muestra se centrifuga durante 5 minutos a 17.949 *g*, el sobrenadante se retira aseptícamente y se desecha, y el sedimento se vuelve a suspender en 20 µl de tampón TE 10 mM a pH 8,0. Las suspensiones se calientan durante 15 minutos a 100°C y luego se enfrían. Antes de las pruebas, las muestras se centrifugan durante 5–10 segundos para eliminar todo posible líquido de la tapa y se analizan inmediatamente o se conservan a –20°C hasta que se analicen. Las muestras conservadas se centrifugan durante 30 segundos antes de realizar la prueba, con el fin de eliminar los restos. El sobrenadante es el extracto o lisado de ADN.

Cada reacción se compone de 2 µl de sobrenadante añadidos a 18 µl de mezcla primaria que contiene TayQF 500 nM y TayQR, EQUI-VIC 250 nM y ASINI-FAM 125 nM. Las variaciones menores en la mezcla primaria o en las concentraciones deben ser validadas en el laboratorio (en la empresa). El ensayo descrito incluye una IPC que consiste en una secuencia fabricada que se añade a cada pocillo junto con el ADN de la muestra y el control de extracción negativo y la sonda específica. La IPC se detecta mediante una sonda correspondiente incluida en la mezcla maestra. La falta de amplificación de este control indica la inhibición de la PCR. Cada corrida incluye una curva estándar (cinco series de dilución) de controles de plantilla de ADN para *T. equigenitalis* junto con IPC para demostrar la eficiencia de la PCR. También se incluyen en cada placa pocillos individuales que contienen controles de PCR de *T. asinigenitalis* e IPC, *Oligella urethralis* e IPC, IPC sola y un control sin plantilla, para demostrar la especificidad de la PCR y su idoneidad para este propósito. Las muestras se analizan por duplicado. Las condiciones del ciclo de PCR son las siguientes: 95°C durante 10 minutos seguido de 45 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 55°C durante 1 minuto. Un valor de TC ≤ 40 para la sonda específica se considera positivo.

Se han utilizado variaciones de controles validadas por el laboratorio, sin embargo, cada placa de PCR debe incluir un control de extracción negativo sin plantilla, controles positivos de *T. equigenitalis* y *T. asinigenitalis* y un control IPC, como mínimo. También es aconsejable una prueba de control que muestre la presencia de bacterias o de ADN bacteriano para confirmar que los hisopos han sido inoculados.

Tabla 2. Secuencias de cebadores para utilizar en las PCR en tiempo real recomendadas

Cebador 1 (directo)		Cebador 2 (inverso, secuencia de 5' a 3')		Sonda (solo para PCR en tiempo real)		Referencia
Nombre	Secuencia de 5' a 3'	Nombre	Secuencia de 5' a 3'	Nombre	Secuencia de 5' a 3'	
Tay377 for	CCG-CGT-GTG-CGA-TTG-A	Tay488 rev	TTT-GCC-GGT-GCT-TAT-TCT-TCA	Tequi FAM-sonda TasiniHE X-sonda	6FAM-AAA-GGT-TTG-TGT-TAA-TAC-CAT-GGA-CTG-CTG-ACG-G-BHQ1 HEX-AAA-GTT-TTA-GGA-TAA-TAC-CCT-AGG-ATG-CTG-ACG-G-BHQ1	Wakeley et al., 2006
TAYQF	CGC-GTG-TGC-GAT-TGA-A	TAYQR	GCC-GGT-GCT-TAT-TCT-TCA	EQUI-VIC (o HEX)	(HEX) VIC-AGG-TTT-GTG-TTA-ATA-CCA-TGG-ACT-GCT-GAC-QSY7 (BHQ1 if using HEX)	Nadin-Davies et al, 2015
				ASINI-FAM	FAM-AGT-TTT-AGG-ATA-ATA-CCC-TAG-GAT-GCT-GAC-GGT-BHQ1	

Si se utiliza HEX en estas dos PCR en tiempo real, las especies de *Taylorella* que utilizan las etiquetas HEX y FAM son opuestas (Tabla 2).

No es necesario mantener la viabilidad del microorganismo para las PCR en tiempo real recomendadas, por lo que los hisopos pueden transportarse a temperatura ambiente. Para las pruebas de PCR no es necesario utilizar un medio de transporte para llevar los hisopos al laboratorio. Se pueden utilizar hisopos en fundas simples sin medio de transporte. Se recomienda que los hisopos para la PCR se analicen no más de 7 días después de la toma de muestras.

La detección directa de *T. equigenitalis* por PCR en tiempo real tiene varias ventajas sobre el aislamiento de las bacterias por cultivo. En primer lugar, la PCR es menos vulnerable a la flora contaminante, lo que reduce el número de resultados negativos falsos. En segundo lugar, el tiempo de respuesta de la PCR es mucho más corto que el tiempo mínimo de cultivo de 7 días con aislamiento. Y en tercer lugar, dado que solo se detecta ADN en lugar de microorganismos viables, se reduce la necesidad de transporte rápido de muestras al laboratorio. Un estricto régimen de PCR para evitar la contaminación cruzada de ADN debería implementarse en los laboratorios de diagnóstico. En cuarto lugar, estas PCR también diferencian entre *T. equigenitalis* y *T. asinigenitalis*.

1.5.2. Otras PCR

Se han desarrollado otras PCR convencionales y en tiempo real y existen kits comerciales de PCR para la detección de *T. equigenitalis*. Antes de utilizarlos en un laboratorio de diagnóstico, deben ser plenamente validados según las normas de la OIE (capítulo 1.1.6) como aptos para su uso con fines definidos.

1.5.3. Métodos basados en la secuenciación

Se han utilizado métodos basados en la secuenciación, como la secuenciación del gen 16s rRNA, para confirmar la identificación de *Taylorella* spp. (Erdman et al., 2011). Los avances en la secuenciación del genoma completo han dado lugar a herramientas adicionales de identificación y tipificación, así como a una mejor caracterización molecular de *Taylorella* spp. El esquema de tipificación de secuencias multilocus (MLST) se ha utilizado para la tipificación de *Taylorella* spp. y la definición de complejos clonales que describen con mayor detalle las relaciones genéticas entre los tipos de secuencias (Duquesne et al., 2013). Estudios recientes también han demostrado

el uso de MLST, análisis de polimorfismo de un solo nucleótido y otros métodos genómicos para caracterizar las cepas, evaluar las relaciones genéticas detalladas entre las cepas aisladas y generar árboles filogenéticos, que pueden resultar útiles para comprender los patrones de transmisión y para el rastreo epidemiológico (Duquesne *et al.*, 2020; Hicks *et al.*, 2018). Una nueva investigación ha explorado la amplificación dirigida a partir de esperma e hisopos para la tipificación de secuencias independientes del cultivo utilizando MLST (May *et al.*, 2019).

1.6. Uso de pruebas de identificación del agente

1.6.1. Pruebas post-tratamiento

Después de que un caballo haya sido tratado para eliminar *T. equigenitalis*, se puede utilizar el cultivo o la PCR para determinar la presencia continua de la infección o saber si es portador. La detección mediante cultivo puede verse inhibida por el arrastre del agente antimicrobiano del hisopo a la placa de cultivo, por daños subletales al microorganismo que impiden su crecimiento *in vitro* o por el crecimiento excesivo de microorganismos competidores. La PCR detecta el ADN tanto del microorganismo viable como del no viable. Si el tratamiento no incluye un lavado adecuado de los restos de los lugares anatómicos utilizados para el hisopado, puede persistir el ADN del microorganismo muerto. Por estas razones, es habitual realizar la prueba por cualquiera de los dos métodos al menos 21 días después del tratamiento. En la mayoría de los casos, un tratamiento adecuado dará lugar a resultados negativos con ambos métodos. Sin embargo, si se encuentran resultados discordantes entre el cultivo y la PCR, es aconsejable asumir que la infección puede estar todavía presente y considerar un nuevo tratamiento para eliminar el microorganismo.

1.6.2. Análisis de esperma

La Tabla 1 hace referencia a las pruebas validadas para su uso con hisopos genitales en lugar de con esperma. Hay pocos datos disponibles sobre la sensibilidad diagnóstica relativa del análisis del esperma en comparación con los hisopos genitales del semental (Al-Kass *et al.*, 2019; Erdman *et al.*, 2011). Por lo tanto, las pruebas de esperma suelen utilizarse como un complemento y no como un sustituto del hisopado del caballo. Hay pocos datos sobre el uso del cultivo o la PCR en el esperma o la viabilidad del microorganismo en tránsito. Los datos publicados indican que el microorganismo puede seguir siendo viable después de congelar el esperma, y que puede recuperarse fácilmente del esperma fresco mediante cultivo. Su crecimiento en cultivo suele estar completamente inhibido por los antibióticos del diluyente de esperma (Klein *et al.*, 2012; Olivieri *et al.*, 2011), pero no siempre es así, y el esperma puede seguir siendo infeccioso en presencia del diluyente (Delerue *et al.*, 2019). Otros datos de un estudio de adición de esperma indicaron que el cultivo puede ser muy sensible si el esperma es puro y fresco, pero el esperma extendido que contiene antibióticos mostró un nivel de detección rápidamente reducido, y la refrigeración de las muestras de esperma durante muchos días dio lugar a una mala detección de *T. equigenitalis* por cultivo tanto para el esperma puro como para el extendido debido al sobrecrecimiento de microorganismos comensales. Una PCR en tiempo real (Wakeley *et al.*, 2006) con un paso de extracción de ADN utilizado en las mismas muestras fue razonablemente sensible y no disminuyó por el diluyente ni por la conservación. Existe un límite inherente a la sensibilidad analítica de la PCR debido a la cantidad de esperma que se utiliza en los pasos de extracción y reacción del ADN, pero no se sabe si esto limita la sensibilidad diagnóstica en los caballos portadores, ya que hay pocos datos sobre los recuentos esperados de células viables de *T. equigenitalis* en el esperma de caballos infectados. Un estudio en el que se utilizó la PCR en tiempo real en muestras de esperma extendido congelado de un caballo infectado de forma natural indicó que el análisis de múltiples alícuotas de cada eyaculado puede mejorar la sensibilidad para detectar si el caballo donante estaba infectado (Schulman *et al.*, 2016). No se ha descrito mucho la sensibilidad del cultivo del esperma extendido congelado, pero las limitaciones del cultivo de esperma extendido fresco se aplican al menos a las muestras congeladas. Tanto las alícuotas de esperma como los hisopos sumergidos en esperma se han utilizado como muestras para el cultivo y la PCR, y se aplican las mismas condiciones de tránsito que para las muestras de hisopos de caballo.

2. Pruebas serológicas

Ninguna prueba serológica descrita hasta la fecha podrá, por si misma, detectar la infección de manera fiable con vistas al diagnóstico y el control. Sin embargo, la prueba de la fijación del complemento se ha empleado con éxito como ayuda al cultivo de *T. equigenitalis* para el análisis de las yeguas entre los 21 y los 45 días después de ser cruzadas con un semental sospechoso de ser portador.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

Todavía no se dispone de vacunas que protejan frente a la metritis equina contagiosa o prevengan la colonización por *T. equigenitalis*.

BIBLIOGRAFÍA

AL-KASS Z., ERIKSSON E., BAGGE E., WALLGREN M. & MORRELL J.M. (2019). Bacteria detected in the genital tract, esperma or pre-ejaculatory fluid of Swedish stallions from 2007 to 2017. *Acta Vet. Scand.*, **61**, 25.

ANZAI T., EGUCHI M., SEKIZAKI T., KAMADA M., YAMOTO K. & OKUDA T. (1999). Development of a PCR Test for Rapid Diagnosis of Contagious Equine Metritis. *J. Vet. Med. Sci.*, **61**, 1287–1292.

ANZAI T., WADA R., OKUDA T. & AOKI T. (2002). Evaluation of the field application of PCR in the eradication of contagious equine metritis from Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, **64**, 999–1002.

ATHERTON J.G. (1983). Evaluation of selective supplements used in media for the isolation of the causative organism of contagious equine metritis. *Vet. Rec.*, **113**, 299–300.

BAVERUD V., NYSTROM C. & JOHANSSON K.-E. (2006). Isolation and identification of *Taylorella asinigenitalis* from the genital tract of a stallion, first case of a natural infection. *Vet. Microbiol.*, **116**, 294–300.

BELLOY L., FERRIERA M. & WALDVOGEL A.S. (2012). Diagnosis of *taylorella equigenitalis* by culture or by real time PCR. *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, **154**, 87–88.

BLEUMINK-PLUYM N.M.C., VAN DIJK L., VAN VLIET A.H., VAN DER GIESSEN J.W. & VAN DER ZEIJST B.A. (1993). Phylogenetic position of *Taylorella equigenitalis* determined by analysis of amplified 16S ribosomal DNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **43**, 618–621.

BREUIL M.S.F., DUQUESNE F., SEVIN C., LAUGIER C. & PETRY S. (2010). Indirect immunofluorescence test using polyclonal antibodies for the detection of *T. equigenitalis*. *Res. Vet. Sci.*, **88**, 369–371.

BREUIL M.F., DUQUESNE F., LAUGIER C. & PETRY S. (2011). Phenotypic and 16S ribosomal RNA gene diversity of *Taylorella asinigenitalis* strains isolated between 1995 and 2008. *Vet. Microbiol.*, **148**, 260–266.

DELERUE M., BREUIL M.F., DUQUESNE F., BAYON-AUBOYER M.H., AMENNA-BERNARD N. & PETRY S. (2019). Acute Endometritis due to *Taylorella equigenitalis* Transmission by Insemination of Cryopreserved Stallion Esperma. *J. Equine Vet. Sci.*, **78**, 10–13.

DUQUESNE F., PRONOST S., LAUGIER C. & PETRY S. (2007). Identification of *Taylorella equigenitalis* responsible for contagious equine metritis in equine genital swabs by direct polymerase chain reaction. *Res. Vet. Sci.*, **82**, 47–49.

DUQUESNE F., HEBERT L., BREUIL M-F., MATSUDA M., LUGIER C. & PETRY S. (2013). Development of a single multi-locus sequence typing scheme for *Taylorella equigenitalis* and *Taylorella asinigenitalis*. *Vet. Microbiol.*, **167**, 609–618.

DUQUESNE F., MERLIN A., PÉREZ-COBO I., SEDLÁK K., MELZER F., OVERESCH G., FRETIN D., IWANIAK W., BREUIL M.F., WERNERY U., HICKS J., AGÜERO-GARCÍA M., FRÍAS-SERRANO N., SAN MIGUEL-IBÁÑEZ E., PATRASOVÁ E., WALDVOGEL A., SZULOWSKI K., JOSEPH M., JEEBA J., SHANTY J. & PETRY S. (2020). Overview of spatio-temporal distribution inferred by multi-locus sequence

typing of *Taylorella equigenitalis* isolated worldwide from 1977 to 2018 in equidae. *Vet. Microbiol.*, **242**, 108597. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108597>

ERDMAN M.M., CREEKMORE L.H., FOX P.E., PELZEL A.M., PORTER-SPALDING B.A., AALSBERG A.M., COX L.K., MORNINGSTAR-SHAW B.R. & CROM R.L. (2011). Diagnostic and epidemiologic analysis of the 2008–2010 investigation of a multi-year outbreak of contagious equine metritis in the United States. *Prev. Vet. Med.*, **101**, 219–228.

FERNIE D.S., BATTY I., WALKER P.D., PLATT H., MACKINTOSH M.E. & SIMPSON D.J. (1980). Observations on vaccine and post-infection immunity in contagious equine metritis. *Res. Vet. Sci.*, **28**, 362–367.

HICKS J., STUBER T., LANTZ K., ERDMAN M., ROBBE-AUSTERMAN S. & HUANG X. (2018). Genomic diversity of *Taylorella equigenitalis* introduced into the United States from 1978 to 2012. *PLoS ONE*, **13** (3): e0194253.

JEOUNG H.-Y., LEE S.-K., PARK J.-Y., KIM H.-J., YANG S.-J., LEE S.-K., KO J.A., YANG H.-S., PARK C., KIM S.-H., KANG H.-E. & CHOI J.-G. (2018). Status of *Taylorella equigenitalis* in Thoroughbred Horses in the Republic of Korea and the Molecular Characterisation of the Korean *Taylorella equigenitalis* Isolates. *J. Equine Vet. Sci.*, **69**, 102–107.

KLEIN C., DONAHUE J.M., SELLS S.F., SQUIRES E.L., TIMONEY P.J. & TROEDSSON M.H.T. (2012). Effect of antimicrobial-containing esperma extender on risk of dissemination of contagious equine metritis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **241**, 916–921.

MAWHINNEY I. (2020). 10 years of *Taylorella equigenitalis* ring trial results comparing culture and polymerase chain reaction. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **39**,

MAWHINNEY I., ERRINGTON J., STAMPER N., TORRENS N., ENGELSMAN M.Y. & VAN ROEST H.-J. (2019). Pooling of genital swabs for detection by PCR of *Taylorella equigenitalis*, the cause of contagious equine metritis. *Equine Vet. J.*, **51**, 227–230.

MAY C.E., GUTHRIE A.J., KEYS B., JOONE C., MONYAI M. & SCHULMAN M.L. (2016). Polymerase chain reaction-based national surveillance programme to determine the distribution and prevalence of *Taylorella equigenitalis* in South African horses. *Equine Vet. J.*, **48**, 307–311.

MAY C.E., GUTHRIE A.J. & SCHULMAN M.L. (2019). Direct culture-independent sequence typing of *Taylorella equigenitalis* obtained from genital swabs and frozen esperma samples from South African horses. *J. Vet. Diagn. Invest.* **31**, 792–794.

NADIN-DAVIS S., KNOWLES M.K., BURKE T., BOSE R. & DEVENISH J. (2015). Comparison of culture versus quantitative real-time polymerase chain reaction for the detection of *Taylorella equigenitalis* in field samples from naturally infected horses in Canada and Germany. *Can. J. Vet. Res.*, **79**, 161–169.

OLIVIERI B.T., LOVE B.C., REZEBAK G.B., LAMM C.G., VARNER D.D., PAYTON M.E. & HOLYOAK G.R. (2011). Effect of Antibiotic-containing Extenders on *Taylorella equigenitalis* Contaminated Esperma. *J. Equine Vet. Sci.*, **31**, 655–660.

OUSEY J.C., PALMER L., CASH R.S.G., GRIMES K.J., FLETCHER A.P., BARRELET A., FOOTE A.K., MANNING F.M. & RICKETTS S.W. (2009) An investigation into the suitability of a commercial real-time PCR assay to screen for *Taylorella equigenitalis* in routine prebreeding equine genital swabs. *Equine Vet. J.*, **41**, 878–882.

PETRY S., BREUIL M-F., DUQUESNE F. & LAUGIER C. (2018) Towards European harmonisation of contagious equine metritis diagnosis through interlaboratory trials. 10.1136/vr.104556. *Vet. Rec.*, **183**, 96.

PETRY S., PY J., WILHELM A., DUQUESNE F., BAYON-AUBOYER M., MORVAN H. & GASSILLOU B. (2019) Evaluation of MALDI-TOF MS and an expanded custom reference spectra database for the identification and differentiation of *Taylorella equigenitalis* and *Taylorella asinigenitalis*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **94**, 326–330.

SAHU S.P., DARDIRI A.H., ROMMEL F.A. & PIERSON R.E. (1979). Survival of contagious equine metritis bacteria in transport media. *Am. J. Vet. Res.*, **40**, 1040–1042.

SCHULMAN M.L., MAY C.E., FOSGATE G. & GUTHRIE A.J. (2016). Sensitivity of qPCR for screening cryopreserved esperma from *Taylorella equigenitalis*-carrier stallions, 10th IEIDC Abstracts. *J. Equine Vet. Sci.*, **39**, S60-S61.

SWERCZEK T.W. (1978). Inhibition of the CEM organism by the normal flora of the reproductive tract. *Vet. Rec.*, **103**, 125.

TER LAAK E.A. & WAGENAARS C.M.F. (1990). Autoagglutination and the specificity of the indirect fluorescent antibody test applied to the identification of *Taylorella equigenitalis*. *Res. Vet. Sci.*, **49**, 117-119.

TIMONEY P.J. & POWELL D.G. (1982). Isolation of the contagious equine metritis organism from colts and fillies in the United Kingdom and Ireland. *Vet. Rec.*, **111**, 478-482.

WAKELEY P.R., ERRINGTON J., HANNON S., ROEST H.I.J., CARSON T. HUNT B. & HEATH P. (2006). Development of a real time PCR for the detection of *Taylorella equigenitalis* directly from genital swabs and discrimination from *T. asinigenitalis*. *Vet. Microbiol.*, **118**, 247-254.

WARD J., HOURIGAN M., MCGUIRK J. & GOGARTY A. (1984). Incubation times for primary isolation of contagious equine metritis organism. *Vet. Rec.*, **114**, 298.

*
* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la metritis contagiosa equina
(puede consultarse la página web de la OIE:

<https://www.woah.org/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>)

Por favor, contacte con los Laboratorios de Referencia de la OIE para cualquier otro dato sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la metritis contagiosa equina.

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1990. ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2022.