

244

**AISLAMIENTO DE MYCOPLASMA SPP A PARTIR
 CONJUNTIVITIS EN CABRAS**

**Tesis presentada ante la División de Estudios Profesionales de
 la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad
 Nacional Autónoma de México**

PARA LA OBTENCION DEL TITULO DE

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P O R

ANA LETICIA ROMO GARCIA

1984



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESUMEN

ROMO GARCIA, ANA LETICIA. Aislamiento de Mycoplasma spp. a partir de conjuntivitis en cabras (Bajo la asesoría de : Alfonso Valdivieso-García).

Se colectaron muestras de ojos de caprino con lesiones de queratoconjuntivitis con el propósito de identificar los micoplasmas involucrados en ese hato; probando para este fin el medio base de Hayflick adicionado con extracto de conjuntivas (B1), extracto de globo ocular (B2), suero fetal caprino (B3), suero fetal ovino (B4), glutamina (B5), y diversas combinaciones de estos componentes para enriquecer el medio y determinar su concentración óptima. Asimismo se buscaron otras posibles bacterias presentes. De todas las muestras se aisló Neisseria ovis y sólo de tres muestras se aisló Mycoplasma spp.; sin embargo los medios probados no mostraron alguna diferencia aparente ni facilitaron el desarrollo ni la adaptabilidad de las cepas de micoplasmas, por lo que éstas no pudieron obtenerse en cantidad suficiente para ser identificadas bioquímica y serológicamente; concluyendo que aunque existe la conjuntivitis asociada con micoplasmas, también existen otras bacterias implicadas en el problema. Es necesario conocer aún más sobre los factores nutricionales y sobre los posibles elementos inhibidores que interfieren directamente con la adaptación y el desarrollo de ciertas cepas para facilitar la identificación y otro tipo de estudios sobre estos microorganismos.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
INTRODUCCIÓN.....	1
MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
RESULTADOS.....	29
DISCUSIÓN.....	46
LITERATURA CITADA.....	52

INTRODUCCIÓN

Existe un complejo llamado Oftalmía contagiosa, que comprende lesiones de conjuntivitis y queratoconjuntivitis. La conjuntivitis es una inflamación de la conjuntiva ocasionada por irritación frecuente, si el epitelio conjuntivo sufre una queratinización a causa de irritación constante se denomina queratoconjuntivitis (29,38).

La enfermedad afecta primordialmente a ovinos, caprinos y gamuzas aunque otras especies la padecen como es el caso de los bovinos, ratón, perro, gato y el hombre (34,38).

Esta enfermedad ha sido reportada en Europa, Asia, Australia y América del Norte, por lo que se le considera de distribución mundial, no obstante que existe un mayor número de reportes provenientes de Canadá, Estados Unidos, Suiza y Australia (28,38).

La enfermedad ocurre esporádicamente, ya sea en condiciones de pastoreo o confinamiento, con mayor incidencia en primavera y verano afectando todas las edades, sólo que en el caso de cabras, se ha observado en neonatos y una mayor incidencia y susceptibilidad en cabritos jóvenes (4,34,38,43).

La morbilidad se reporta entre 10-94% (4,29), la mortalidad es baja, sin embargo afecta a los animales haciéndoles sufrir de un estado general de angustia que repercute directamente en la economía de la explotación (29,39), bajando temporalmente la inmunidad del individuo y favoreciendo la presentación de otras enfermedades (28).

La oftalmía comienza con un lagrimeo excesivo hasta el quinto día de presentación, observándose en este período hipervascularización de la conjuntiva bulbar y palpebral, hiperemia, eritema, hiperestesia, congestión de vasos conjuntivales edema e hipertrofia del tejido conjuntival (4,28). Si los signos continúan, la lesión se vuelve más severa generando opacidad corneal y ulceración de la misma (16,42).

Las causas del complejo pueden reducirse a tres grandes grupos: traumático, químico o infeccioso (38), refiriéndonos a este último, se han asociado al síndrome: Chlamydia, Neisseria ovis, Rickettsia y Mycoplasma. Otros agentes han sido aislados como Escherichia coli, Streptococcus y Pseudomonas no obstante de haberse considerado como contaminantes (8,10,12,13, 29,38,39).

Los micoplasmas frecuentemente asociados a la enfermedad son: Mycoplasma arginini, Acholeplasma oculi, Mycoplasma

agalactiae (43), Mycoplasma mycoides subsp capri, Ureaplasma urealitycum y Mycoplasma conjunctivae (5); sin embargo éste último ha sido el único que habiendo sido inoculado experimentalmente en animales, ha sido capaz de reproducir la enfermedad siendo exclusivo para ovinos, caprinos y gamuzas (9,10,12,13, 20,38,39,43), no obstante, las demás especies pueden producir la oftalmía debido a secuelas de enfermedades más graves (38).

Los micoplasmas han sido aislados de ojos sanos o enfermos (12), por lo que se ha sugerido la existencia de factores externos que favorecen la infección (4).

El diagnóstico de la enfermedad se realiza por la observación de signos clínicos, sin embargo se requiere del aislamiento e identificación para un diagnóstico diferencial (38). No obstante en el caso de micoplasmas, el diagnóstico no es fácil ya que a pesar de que se encuentran asociados a una gran cantidad de enfermedades como poliartritis, metritis, neumonías, edema generalizado, mastitis y conjuntivitis (8,17,26,43) abarcando todas las especies animales domésticas útiles al hombre, poco se sabe aún sobre ellos, algunos autores coinciden en la necesidad de aclaración sobre puntos relacionados a este género como son: crecimiento, cultivo, etiología, patogenia, factores predisponentes y fisiopatología, por lo que cualquier tipo de estudio que aclare estas incógnitas será de utilidad para

estudios posteriores (4,5,11,28,29,30,38,41,43).

La necesidad de profundizar en el conocimiento de este género estriba en que ha sido estudiado relativamente poco, el primer dato registrado data del año 1898, a partir de entonces muchos autores han incursionado en varios aspectos relacionados con ellos (cuadro No. 1).

Los micoplasmas pertenecen a la clase Mollicutes y sus características primordiales se encuentran expresadas en el cuadro No. 2.

Son microorganismos de difícil cultivo tanto al aislamiento como en cultivos posteriores, algunos autores han observado que el 70% de los micoplasmas aislados, son incapaces de desarrollarse en subcultivos dificultándose así el mantenimiento de los cultivos para la identificación posterior, acarreándose con esto, problemas en la bacteriología práctica (25,38).

Las causas posibles de la dificultad del crecimiento y el mantenimiento de las cepas se puede resumir en los siguientes puntos:

CUADRO No 1

PRIMEROS AISLAMIENTOS REPORTADOS DE MYCOPLASMAS DE DI -
VERSOS ORÍGENES (25)

AÑO	REFERENCIA INICIAL	LOCALIZACION
1898	Nocard <u>et al.</u>	Bovino
1923	Bidré & Donatien	Caprino
1923	Bidré & Donatien	Ovino
1934	Shoetensack	Perro
1935	Klienenberger	Cuye
1935	Nelson	Pollo
1935	Nelson	Ratón
1936	Laidlaw & Elford	Drenaje
1937	Klienenberger & Steabben	Rata
1937	Sieffert	Suelo
1944	Beller	Caballo
1952	Carrere	Insectos
1952	Markham & Wong	Pavo
1954	Heimbeck	Planta
1955	Switzer	Cerdo
1956	Mathey <u>et al.</u>	Pichón
1956	Robinson <u>et al.</u>	Cultivo de tejidos
1957	Adler	Periquito aust.
1960	Ito	Conejo
1960	Ito	Hamster
1963	Robinson-Taylor <u>et al.</u>	Mono
1967	Cole <u>et al.</u>	Gato
1971	Barber & Fabricant	Faisán
1971	Barber & Fabricant	Pato
1971	Tan <u>et al.</u>	Puercoespín

CUADRO No 2

TAXONOMIA DE LA CLASE MOLLICUTES (44)

- Clase: Mollicutes
Orden: Mycoplasmatales
Familia I: Mycoplasmataceae
1.- Requerimiento de esteróles para crecer
2.- Tamaño de genoma 5.0×10^8 daltons
3.- NADH oxidasa localizada en citoplasma
Género I: Mycoplasma (aproximadamente 50 especies)
Género II: Ureaplasma (una especie con serotipos)
1.- Hidrólisis de la urea.
- Familia II: Acholeplasmataceae
1.- Sin requerimiento de esteróles para su crecimiento.
2.-Tamaño de genoma 1.0×10^9 daltons
3.-NADH oxidasa localizada en membrana
Género I: Acholeplasma (8 especies)
- Familia III: Spiroplasmataceae (propuesto)
1.- Forma helicoidal durante algunas fases de crecimiento.
2.- Requerimientos de esteróles para su crecimiento.
3.- Tamaño de genoma de 1.0×10^9 daltons
4.- NADH oxidasa localizada en citoplasma
Género I: Spiroplasma (4 especies)
- Géneros de posición taxonómica incierta
Thermoplasma (única especie)
Anaeroplasma (dos especies)
-

- a) No se conocen adecuadamente los requerimientos nutricionales que favorezcan su crecimiento.
- b) Existe actividad micoplasmicida en tejidos por la presencia de lisolecitina y lecitina.
- c) Su crecimiento es inhibido por la presencia de anticuerpos específicos.
- d) Poseen un alto grado de asociación a superficies celulares para obtener precursores de ácidos nucleicos (25,47).

Por estas razones Hayflick opina que probablemente existan nutrientes esenciales en los tejidos originales que puedan facilitar el crecimiento in vitro de los micoplasmas (25,41).

No obstante, se ha observado que los aislamientos pueden tener éxito si se les suple de condiciones y nutrientes especiales, así como de una toma de muestra adecuada (39).

Tipo de muestra.

Esta debe ser lo más fresca, ya que otorga beneficios tales como; bajo número de contaminantes, anticuerpos específicos con bajo título, ausencia de efectos inhibidores de productos celulares (6,16) y por lo tanto la recuperación del mayor número de micoplasmas presentes en la muestra.

Factores nutricionales.

Se debe suplementar los medios de cultivo con factores de crecimiento como son los esteroides, específicamente una alfa 1 lipoproteína (25), son necesarios como factores para obtener precursores de ácidos nucleicos (15). Estos esteroides son agregados al medio de cultivo con sueros que pueden provenir de varias especies, algunos autores recomiendan el suero de equino (4,31,37), otros de ovino (41) y algunos otros de cerdo (28) dependiendo del micoplasma a cultivar, sin embargo otros investigadores opinan que el suero de caballo adulto no es recomendable ya que inhibe a algunos micoplasmas, situación que también comparte el suero humano, en todo caso se recomienda utilizar el suero de caballo sin gammaglobulinas, en un porcentaje del 1-5% del total del medio. El suero fetal de bovino es el mejor por la ausencia o el menor número de anticuerpos preexistente contra micoplasmas (45).

Además de los esteroides, el medio de cultivo debe contener una fuente de aminoácidos que puede ser adicionada mediante infusiones de carne (45).

Otro factor de crecimiento, es el extracto de levadura el cual provee de precursores de ácidos nucleicos (15,22).

Para el cultivo de micoplasmas, se acostumbra suplementar al medio con penicilina para inhibir gérmenes Gram positivos (8,9,20) y acetato de talio para inhibir esporulados aerobios y gérmenes Gram negativos (15). Actualmente el acetato de talio está siendo sustituido por otros antimicrobianos ya que se ha visto, que puede inhibir el crecimiento de Ureaplasma urealitycum y algunas especies de Mycoplasma (19, 32,40).

Además de lo anteriormente citado, el agua utilizada para la elaboración de los medios de cultivo debe ser deionizada o bidestilada ya que de no ser así, puede resultar tóxica a los cultivos inhibiendo el total crecimiento (31,36).

En cuanto a medios sólidos, es necesario utilizar el Ionagar debido a su grado de pureza ya que agares de dudosa calidad pueden afectar el tamaño y número de colonias (31,32).

Condiciones de cultivo.

Respecto a las condiciones de cultivo, es necesario tener sumo cuidado en llevarlas a cabo lo más adecuadamente posible, la mayoría de los micoplasmas crecen en temperaturas de 36-38 °C (8,16,20).

En cuanto a pH, los micoplasmas son sumamente

sensibles a cambios del mismo, su rango es muy estrecho recomendándose como óptimo el de 7.8-8.0 (20,47). Debido a esta situación es aconsejado suplir al medio de cultivo con indicador de pH para poder observar fácilmente cambios en los medios.

En cuanto a condiciones atmosféricas, se les reconoce como gérmenes aerobios aunque pueden crecer en condiciones de anaerobiosis, prefieren concentraciones de 5-10% de CO₂ (8, 15,16,19,32).

Aislamiento.

Este debe llevarse a cabo a partir de muestras frescas y sembrarse en medios líquidos y sólidos con lo que se puede apreciar el desarrollo en diferentes formas:

En medio líquido, el crecimiento es poco manifiesto comparado a los crecimientos bacterianos, por lo que la turbidez es poco manifiesta. Para apreciar el crecimiento con mayor facilidad, al caldo se le adiciona con un indicador de pH y se observa diariamente hasta apreciar un cambio de color, teniendo para este efecto un tubo testigo. En caso de que ningún cambio sea apreciable, se recomienda ejecutar pases ciegos a los tres, siete, catorce y veintiuno días con el fin de adaptar el cultivo al laboratorio (44), sin embargo el aislamiento en muchos casos prefiere más días de incubación en vez de realizar pases ciegos (31).

Para el aislamiento, es también recomendable diluir la muestra con el fin de dispersar otras contaminantes y facilitar así el crecimiento de los micoplasmas presentes (23).

En medio sólidos, el crecimiento se observa por la formación de colonias características en forma de huevo estrellado o huevo frito (7,8,14,20). Estas colonias deben ser purificadas ya que puede existir la posibilidad de que en una misma muestra se encuentren dos tipos de micoplasmas, por esta razón es necesario efectuar la triple clonación sin la cual los procedimientos de identificación quedan invalidados (7).

Identificación.

Previo a este paso, se ha establecido que cualquier cepa sospechosa debe cumplir con requisitos establecidos, sin los cuales no pueden ser considerados como miembros del género Mycoplasma. Los requisitos son los siguientes:

- 1.- Deben ser capaces de crecer en medios artificiales, y en medios sólidos desarrollar colonias características (8,14,16,25,27).
- 2.- Debe ser demostrada la ausencia de pared celular y poseer membrana citoplasmática (7,15,16,20,25,27).
- 3.- No deben revertir a bacterias. Es decir puede existir la posibilidad de que se trate con fase "L" de bacterias debido a la inducción de los antibióticos incorporados al medio.

Esto se demuestra sembrando al micoplasma en un medio sin antibióticos por pases consecutivos (15,16,20,25).

4.- Deben ser capaces de atravesar filtros de 300-450 nanómetros y en algunos casos, filtros de 220 nanómetros (9,17,20,43,46).

Una vez cubiertos los requisitos descritos, se procede a montar las pruebas necesarias para la identificación. Estas pruebas deben realizarse bajo dos condiciones: a) Realizándolas en un medio de cultivo que haya soportado el crecimiento y b) Realizándolas con formulaciones exactas, ya que de no ser así podrían variar los resultados (18).

Tomando en cuenta estos puntos, se procede a realizar las siguientes pruebas: hidrólisis de arginina, glucosa, actividad proteolítica (caseína), requerimiento de esteroides (digitonina), actividad de fosfatasa y reducción de sales de tetrazolio. Los resultados obtenidos nos otorgan el patrón preliminar para realizar otras pruebas bioquímicas y serológicas más específicas para concluir en definitiva la especie con la que se está trabajando (3,8,11,15,26).

Lograda la identificación, es posible hacer un diagnóstico certero para mejorar los tratamientos necesarios así como las medidas preventivas adecuadas, además de establecer nuevas

técnicas para futuros diagnósticos.

No obstante debido a la dificultad que existe para realizar el cultivo de los micoplasmas, es necesario hacer estudios encaminados hacia la búsqueda de los elementos nutricionales idóneos que favorezcan su desarrollo y por lo tanto faciliten su cultivo.

HIPOTESIS

- 1.- Si la enfermedad descrita anteriormente tiene distribución mundial, debe existir también en la población caprina del país.
- 2.- Si los micoplasmas son capaces de desarrollarse en tejidos oculares, serán capaces de reproducirse en medios de cultivo que contengan extractos de estos tejidos así como sueros fetales propios de las especies susceptibles (ovinos y caprinos) con el fin de establecer un medio de cultivo ideal para casos sospechosos de conjuntivitis en cabras ocasionados por micoplasmas.

OBJETIVOS

El objetivo general es promover el crecimiento de los micoplasmas aislados a partir de ojos de caprinos con lesiones de

conjuntivitis, en medios de cultivo suplementados con extractos oculares caprinos y sueros de las especies susceptibles para llegar a la identificación del micoplasma.

- a) Obtener extractos de ojos fetales caprinos así como sueros fetales de ovino, caprino y equino para la elaboración de los medios de cultivo.
- b) Sembrar dichos medios con muestras sospechosas de la enfermedad para comparar el comportamiento de los diferentes medios a fin de encontrar el óptimo para el cultivo.
- c) Identificar las cepas aisladas mediante pruebas bioquímicas y serológicas establecidas.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- Obtención de muestras.

Se colectaron cuatro muestras de cabras con lesiones de conjuntivitis y una más, elegida por el estado general del animal, a partir de ojos caprinos provenientes de cabras del Centro de Recría de la SARH Progreso-Morelos, debido a que en años anteriores se habían aislado muestras sugestivas de Mycoplasma (cuadro No. 3).

El muestreo se llevó a cabo por medio de hisopo estéril previamente humedecido en medio de cultivo Hayflick sin antibióticos (5,41) para evitar la posibilidad de inhibir a los micoplasmas presentes.

El hisopo fue embebido en los fluidos oculares y por último se realizó un raspado conjuntival tanto en la parte bulbar como en la palpebral. Lo mismo fue realizado en ambos ojos y posteriormente las muestras fueron sumergidas con las mismas características anteriormente citadas y se transportaron al laboratorio en un lapso de 2 horas en condiciones de refrigeración (5,30,31,34,41).

2.- Aislamiento.

Las muestras sospechosas fueron procesadas para la obtención y aislamiento de bacterias y micoplasmas. Para las

CUADRO No 3

DATOS DE ANIMALES MUESTREADOS

No de muestra	Raza	Edad	Sexo	Identificación	Lesiones
M-I	Cruza	4 años	M	s/ident. (corral 1)	Queratitis y opacidad corneal, hiperemia conjuntival. Lagrimeo excesivo.
M-II	Senen	2 años	H	s/ident. (corral 10)	Ligera conjuntivitis bulbar y palpebral, hiperemia y escoriación conjuntival.
M-III	Nubian	4 semanas	M	62-67-83 (corral 9)	Lagrimeo excesivo, sin más lesión aparente.
M-IV	Alpino francés	5 semanas	M	62-85-83 (corral 6)	Lagrimeo excesivo, hiperestesia, hiperemia conjuntival, aumento del globo ocular.
M-V	Nubian	4 semanas	M	62-45-83 (corral de cuarentena)	Sin signología ocular aparente. Caquetico y tamaño menor al de su edad.

primeras se realizaron las técnicas de rutina descritas en los manuales de diagnóstico bacteriológico incluyendo frotis directo siembra en medios enriquecidos e identificación por medio de pruebas bioquímicas (9,13,33).

Para el aislamiento de micoplasmas, fueron preparados medios de cultivo basando la proporción de las sustancias a probar en formulaciones de medios establecidos o sugeridos por varios autores (4,5,24,28,37,39,41,42), los medios fueron realizados 24 horas antes del día del muestreo para que fueran lo más frescos posibles.

El medio base (medio B) de los medios de cultivo fue el medio de Hayflick con la variante de la utilización de suero fetal equino en lugar de suero de equino adulto para evitar al máximo inhibiciones del crecimiento por posibles metabolitos o anticuerpos específicos preexistentes en el mismo (45).

La composición del medio base así como las variantes necesarias en cada tipo de medio se expresan en los cuadros número 4 y 5 respectivamente.

CUADRO No 4

COMPOSICION DEL MEDIO BASE

Caldo PPLO ⁽¹⁾	90.0 ml
Acetato de talio (sol w/v 10%) ⁽²⁾	0.25 ml
Rojo de fenol (sol w/v 1%) ⁽³⁾	0.25 ml
Glucosa ⁽⁴⁾	0.50 g
Penicilina (100,000 UI/ml) ⁽⁵⁾	0.50 ml
Ionagar (en caso de medio sólido) ⁽⁶⁾	.75 %
Extracto de levadura	10.0 ml
Suero fetal equino	20.0 ml
Total	121.85 ml

- (1) Caldo PPLO (Laboratorios Difco No cat. 0554-01).
(2) Acetato de talio (K & K Laboratories, Plainview, N.Y. No 22508).
(3) Rojo de fenol (Laboratorios Merck. Art. 7241).
(4) Glucosa (Dextrosa. J.T.Baker No cat. 1910).
(5) Penicilina (Penprocilina. Laboratorios Lakeside No cat. 18775).
(6) Ionagar (Laboratorios Oxoid. No cat. L12).

CUADRO No 5

SUSTANCIAS UTILIZADAS PARA LA ELABORACION DE
LOS MEDIOS DE CULTIVO

NOMINACION DEL MEDIO	SUSTANCIA UTILIZADA	CANTIDAD INCOR_ PORADA A 121.85 DEL MEDIO BASE
B1	Extracto de conjuntivas	18.00 ml
B2	Extracto de globo ocular	18.00 ml
B3	Suero fetal caprino	24.00 ml
B4	Suero fetal ovino	24.00 ml
B5	Glutamina	0.02 g
B6	Suero fetal caprino (sin añadir el suero equino)	20.00 ml
B7	Extracto de globo ocular + extracto de conjuntivas + glutamina	18.00 ml 18.00 ml 0.02 g
B8	Suero fetal de equino (medio base)	20.00 ml

2.1-Preparación de las diferentes sustancias a probar en los medios de cultivo.

a) Sueros fetales.- Para la realización de los medios de cultivo fue necesario obtener sueros a partir de animales provenientes del rastro, ya que los sueros comerciales resultaban excesivamente costosos y poco confiables en cuanto a su calidad y en la posibilidad de que pudieran inhibir los crecimientos (45).

Se eligieron sueros fetales según recomendaciones de algunos autores, siendo los sueros colectados de fetos caprinos, ovinos y equinos (4,30,31,37,41).

Para su colección, se acudió al rastro donde se obtuvieron los fetos aún vivos y por decapitación fue colectada la sangre en frascos fríos y estériles evitando la caída brusca de la misma para evitar al máximo ruptura de eritrocitos. Ya habiendo recolectado aproximadamente 3 litros de sangre por cada especie, ésta fue transportada al laboratorio en condiciones de refrigeración.

Ya en el laboratorio, se colocó en recipientes de plástico limpios y se dejó en refrigeración durante 18 horas para dejar una mayor superficie expuesta y así coleccionar la mayor cantidad de suero posible. Posteriormente se separó el coágulo y, el suero restante fue centrifugado a 4,420 g/15

minutos para separar los posibles eritrocitos restantes, se decantó y se repitió la centrifugación a 48,400 g/ 15 min y por último se eliminó la capa grasa formada en la superficie así como el sedimento.

Obtenido el suero, se procedió a su esterilización por medio de filtración utilizando membranas Millipore* y pre-filtros colocados de la siguiente manera: papel Whatman** 40, membranas de 0.60, 0.45 y 0.22 μ m. Filtrado el suero, se procedió a distribuirlo en tubos previamente lavados y esterilizados según indicaciones para material usado en cultivo celular (36). Se mantuvieron en alícuotas de 20 ml.

Posteriormente se llevó a cabo la inactivación del suero a 56 °C durante 30' (31) y se sembró en gelosa sangre para garantizar así su esterilidad.

b) Extractos oculares.- De los fetos caprinos que fueron utilizados para la obtención del suero, fue colectada la cabeza y transportada en condiciones de refrigeración en un lapso de tres horas , ya en el laboratorio, fueron lavadas con agua corriente y por último enjuagadas con agua destilada estéril.

* Millipore de México, S.A.

** Whatman. W & R, Balston Limited, England.

Bajo este proceso se depositaron en un recipiente frío y estéril, posteriormente se procedió a la enucleación y ya separados los ojos se colectaron por separado globos oculares y conjuntivas.

Los globos oculares fueron lavados una vez más con agua destilada estéril y se mezclaron con 200 ml de solución de Hank fresca, obteniendo moliendas mediante una mezcladora; este líquido fue sometido a un proceso similar al utilizado en la esterilización de los sueros excepto la inactivación.

La misma técnica fue utilizada para realizar la molienda de las conjuntivas y su procesamiento y conservación fue igual a las anteriormente descritas. Los globos oculares y las conjuntivas fueron muestreadas para garantizar su esterilidad.

3.- Siembra de muestras.

Por cada muestra se tenían preparados 4 tubos con 1.8 ml por cada uno de los medios a probar así como una caja, también se tenía preparada una placa de gelosa sangre por muestra (13,33). Se homogenizó la muestra y se retiró el hisopo del medio realizándose una siembra para la obtención de cultivo en cada uno de los medios del cuadro No 5, ya sembradas, el hisopo sirvió para efectuar frotis directos los cuales fueron teñi-

* Waring Blender, Mod 702-B. Waring Products Co. U.S.A.

dos posteriormente con las técnicas de Gram y Giemsa (9,13).

Del medio restante, fue tomado 0.2 ml con micropipeta y se procedió a realizar diluciones decimales por cuatro tubos con el fin de rescatar los cultivos en caso de contaminantes bacterianos (23).

Realizadas las siembras se incubaron durante tres días a 36 °C conservando las cajas en condiciones de velobiosis (33) posterior a ese período, cajas y tubos fueron revisados diariamente durante siete días. En aquellos en donde no se observó crecimiento, se dejaron incubar por tres días más y fueron desechados como negativos ya que el 90% de los tubos y cajas ya habían presentado crecimiento (5).

El parámetro para considerar positivo el crecimiento fue el cambio de pH en los caldos y la observación de colonias en las cajas. El parámetro para evaluar la efectividad de los medios probados fue basado en los siguientes datos:

- CALDOS:
- 1) crecimiento (positivo o negativo) dependiendo del cambio apreciable de pH.
 - 2) tiempo (días) necesarios para el cambio.
- CAJAS:
- 1) crecimiento (positivo o negativo) dependiendo de la existencia de colonias desarrolladas.
 - 2) Tiempo (días) necesarios para el desarrollo de colonias.
 - 3) Tamaño relativo de las colonias (pequeñas o grandes).
 - 4) Número relativo de colonias (abundante, moderado o escaso).

Los caldos positivos fueron congelados a -70°C para su conservación y de las cajas se eligieron aquellas con colonias aparentes.

4.- Subcultivos (Clonaciones).

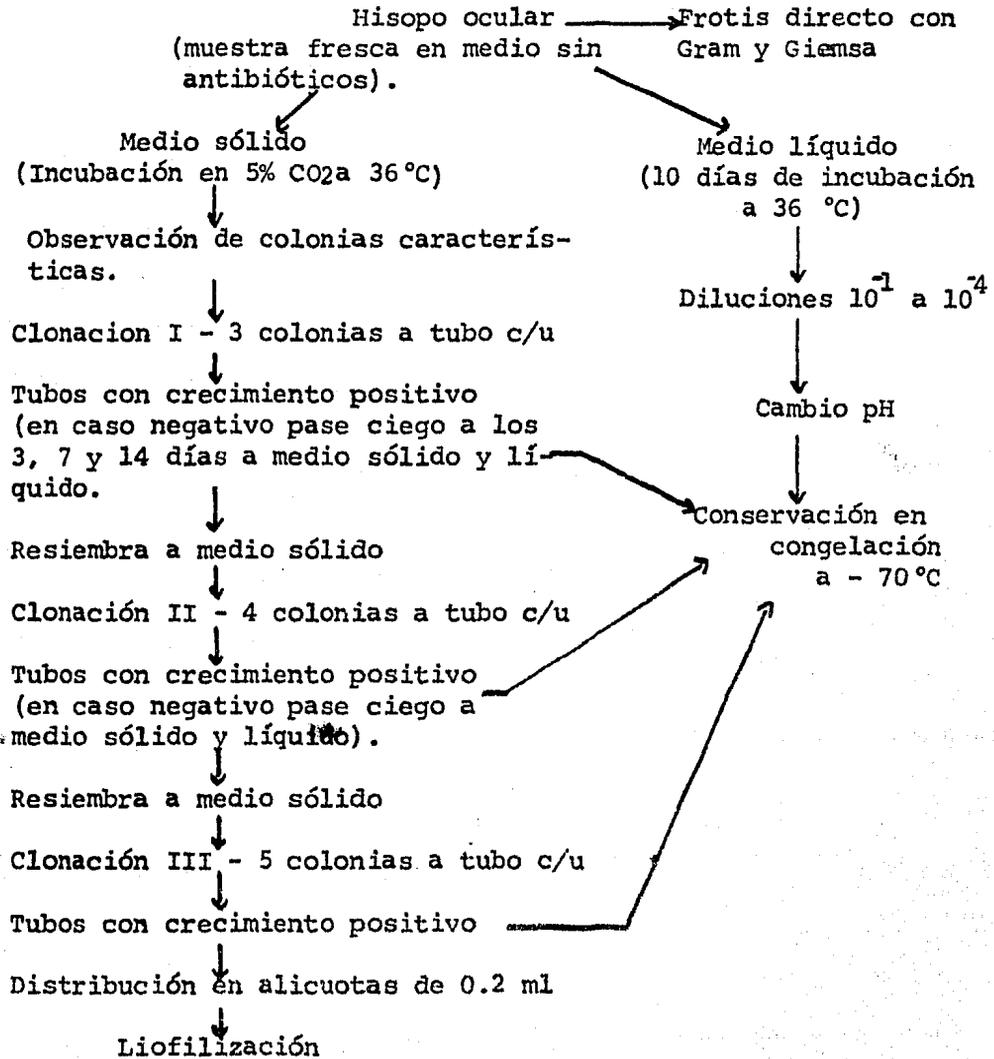
Por cada caja se clonaron tres colonias, y cada una de ellas fue sembrada a un tubo (respetando siempre el tipo de medio de donde provenían), ya así fueron incubados de la misma forma que la realizada en el primocultivo por tres días, en caso de un cambio aparente en el color, eran resembradas a una placa y el resto del medio se congelaba a -70°C , en caso contrario se llevaban a cabo pases ciegos al 3, 7 y 14avo día, si el cambio no era aparente, era considerada como negativa o muerta y la muestra era desechada. Este proceso fue realizado tres veces consecutivas (7). La figura No 1 resume el proceso descrito.

Después de purificados los cultivos, se realizó la liofilización de las cepas subdividiendo cada muestra en alícuotas de 0.2 ml sirviendo como estabilizante el propio medio (1), previa siembra de estos cultivos en una placa para garantizar así que el cultivo continuaba vivo.

Dado que las cepas aisladas no presentaban un patrón de crecimiento uniforme, fue necesario determinar la curva de

FIGURA No 1

PASOS RECOMENDADOS PARA EL AISLAMIENTO DE MYCOPLASMA



crecimiento antes de proceder al montaje de las pruebas para la identificación. Para este fin fueron reconstituidos seis liofilizados por cepa (tres en cada tubo) sembrándose en medio líquido. El crecimiento fue evaluado en medio sólido a las 48, 72, 96, 120 y 144 horas de incubación. El mismo procedimiento se realizó con intervalos de 6 horas.

Posteriormente se realizaron pruebas de filtrabilidad con membranas Millipore con tamaño de poro de 0.45 μm y se sembraron las muestras en medios sin antibióticos para evaluar una posible fase "L" bacteriana.

Simultáneamente se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: glucosa, arginina, tetrazolio, caseína, película y puntos ("film & spots"), digitonina y fosfatasa, estas fueron realizadas de acuerdo a técnicas estandarizadas (3,18), cepas testigo fueron utilizadas para checar la efectividad de las pruebas así como la efectividad de los medios.

Las cepas testigo fueron donadas por el Instituto de Microbiología Médica de la Universidad de Aarhus, Aarhus, Dinamarca incluyendose las siguientes: cepa PG 2 Mycoplasma agalactiae, cepa PG 8 Acholeplasma laidlawii, cepa PG 45 Mycoplasma bovis (Donetta).

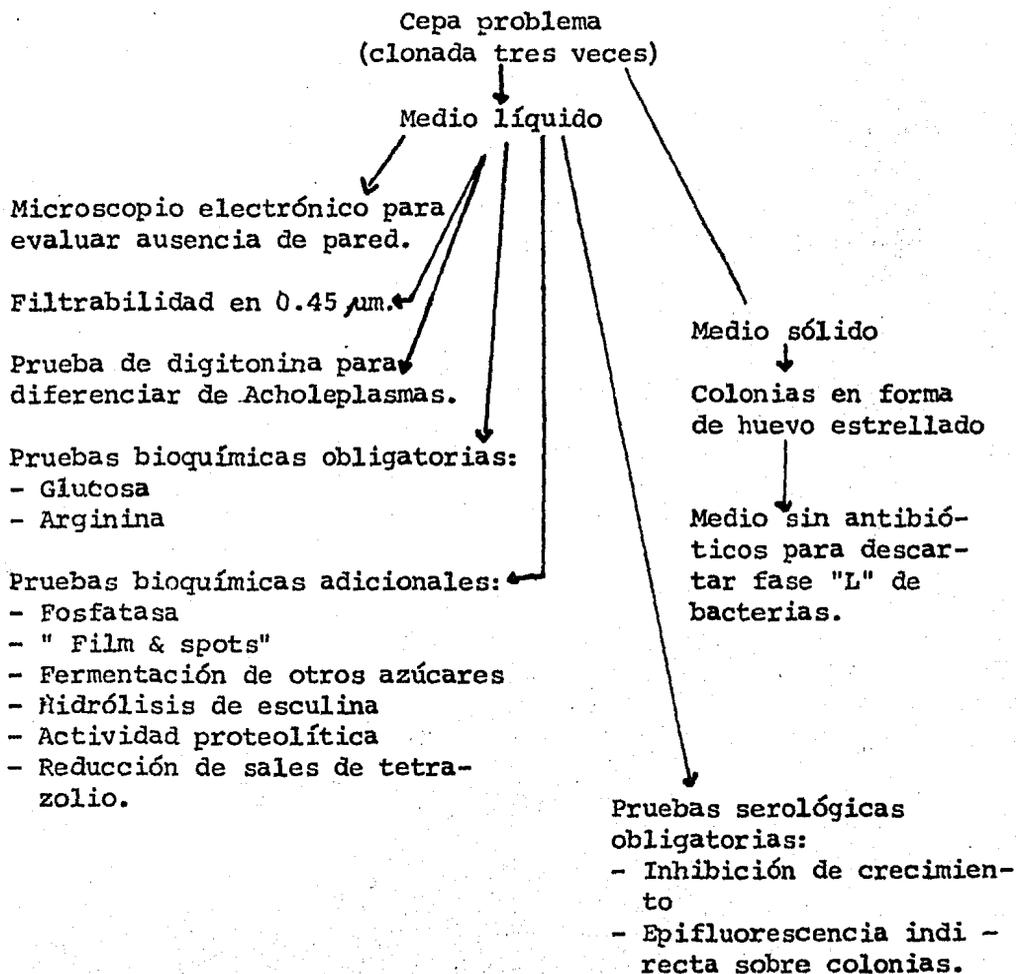
La figura No 2 muestra la secuencia de eventos realizados.

También fue necesario evaluar la temperatura óptima de conservación de cada cepa, esto fue realizado sembrando una muestra por cada cepa en medio líquido, a las 48 y 72 horas postincubación fue colectada una muestra y expuesta a tres condiciones: a) congelación a -70°C b) temperatura ambiente c) refrigeración. La afectación ocasionada por los cambios de temperatura fue evaluada en base a la presencia de colonias y número de las mismas.

Por último, fue necesario resembrar las muestras a medios enriquecidos, o sin antibióticos, o con promotores de crecimiento descritos en la literatura para favorecer la adaptabilidad de las cepas al cultivo en el laboratorio post-liofilización (2,5,11,21,22,23,32,35,40,19).

FIGURA No 2

DIAGRAMA DE FLUJO UTILIZADO PARA LA IDENTIFICACION DE MICOPLASMAS



RESULTADOS

1.- Observación de frotis directos.

Frotis teñidos con técnica de Gram:

Muestra I	Bacilos delgados y cocos gram negativos escasos.
Muestra II	No se observaron bacterias.
Muestra III	Bacilos delgados gram negativos escasos.
Muestra IV	Bacilos delgados y cocos gram negativos escasos.
Muestra V	No se observaron bacterias.

Frotis teñidos con técnica de Giemsa:

Muestra I	Formas cocoides
Muestra II	Formas cocoides
Muestra III	Restos celulares y formas sugestivas de micoplasmas.
Muestra IV	Restos celulares y formas sugestivas de micoplasmas.
Muestra V	Restos celulares y formas sugestivas de micoplasmas.

2.- Aislamiento de cepas.

2.1.- Cepas bacterianas.

A las 72 horas de incubación a 37°C se observaron -- cultivos puros de colonias redondas, grisáceas, mucoides, con -- borde entero ondulado y alfa hemólisis, con tamaño de 0.3 a 0.5 cm. con crecimiento abundante, al frotis se observaron cocos Gram negativos, con base en estos datos, se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas:

Catalasa	(+)
Oxidasa	(+)
Reducción de nitratos	(+)
Crecimiento a temperatura ambiente	(+)

Crecimiento en Tripticasa	
soya agar 48 horas	(+)
Lactosa	(-)
Maltosa	(-)
Sucrosa	(-)
Oxidación/fermentación	(-)
Producción de gas en glucosa	(-)

Correspondiendo la identificación final a Neisseria ovis (Branhmanella ovis) (13).

2.2 Cepas de micoplasma.

Los resultados de primocultivo, primera, segunda y tercera clonación se muestran a continuación:

2.2.1 Primocultivo.

Las muestras I y II no mostraron crecimiento de micoplasmas en ninguno de los medios sembrados; las muestras III, IV y V presentaron crecimientos según se expresa en los cuadros número 6 y 7 en donde además de los crecimientos, se evaluó la efectividad de los medios según descripción anterior.

2.2.2...- Primera clonación.

Los resultados se resumen en el cuadro número 8.

2.2.3.- Segunda clonación.

Los resultados se expresan en el cuadro número 9.

2.2.4.- Tercera clonación.

CUADRO No 6

EVALUACION DEL CRECIMIENTO DE MICOPLASMAS AL AISLAMIENTO
PRIMARIO EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO

MEDIO LIQUIDO	DILUCION	MUESTRA III	MUESTRA IV	MUESTRA V
B1	10 ⁻¹	(+2)	(+2)	(-7)
	10 ⁻²	(+3) †	(+2)	(-7)
	10 ⁻³	(+4)	(+2)	(-7)
	10 ⁻⁴	(+4)	(-7)	(-7)
B2	10 ⁻¹	(+2)	(+2)	contaminado
	10 ⁻²	(+2)	(+4)	(+4)
	10 ⁻³	(+3)	(-7)	(-7)
	10 ⁻⁴	(+4)	(-7)	(-7)
B3	10 ⁻¹	(+2)	(+3)	(+3)
	10 ⁻²	(+2)	(+3)	(-7)
	10 ⁻³	(+2)	(+3)	(-7)
	10 ⁻⁴	(-7)	(+3)	(-7)
B4	10 ⁻¹	(-7)	(-7)	(-7)
	10 ⁻²	(-7)	(-7)	(-7)
	10 ⁻³	(-7)	(-7)	(-7)
	10 ⁻⁴	(-7)	(-7)	(-7)

+ : cambio de pH aparente

- : sin cambio de pH aparente

(dígito en el parentesis) : número de días necesarios para hacer una lectura.

CUADRO No 6 (continuación)

EVALUACION DEL CRECIMIENTO DE MICOPLASMAS AL AISLAMIENTO
PRIMARIO EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO

MEDIO LIQUIDO	DILUCION	MUESTRA III	MUESTRA IV	MUESTRA V
B5	10 ⁻¹	(+2)	(+4)	(+4)
	10 ⁻²	(+2)	(+4)	(+4)
	10 ⁻³	(+3)	(+4)	(-7)
	10 ⁻⁴	(+3)	(+4)	(-7)
B6	10 ⁻¹	(+2)	(+4)	(-7)
	10 ⁻²	(+2)	(+4)	(-7)
	10 ⁻³	(+3)	(+4)	(-7)
	10 ⁻⁴	(-7)	(-7)	(-7)
B7	10 ⁻¹	(+3)	(+4)	(-7)
	10 ⁻²	(+3)	(+4)	(-7)
	10 ⁻³	(+3)	(+5)	(-7)
	10 ⁻⁴	(+3)	(-7)	(-7)
B8	10 ⁻¹	(+2)	(+2)	contaminado
	10 ⁻²	(+3)	(+4)	(+4)
	10 ⁻³	(+4)	(+4)	(-7)
	10 ⁻⁴	(-7)	(-7)	(-7)

+ : cambio de pH
aparente

- : sin cambio de
aparente

(dígito en el paréntesis) : número de días
necesarios para hacer una lectura.

CUADRO No 7

EVALUACION DEL CRECIMIENTO DE MICOPLASMAS AL AISLAMIENTO PRIMARIO EN
DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO

MEDIO SOLIDO	EVALUACION DE CLONAS	MUESTRA III	MUESTRA IV	MUESTRA V
B1	Crecimiento	(+)	(+)	(-)
	Tiempo-días	(4)	(3)	(7)
	Tamaño relativo	pequeñas	pequeñas	-
	Número relativo	moderado	escaso	-
B2	Crecimiento	(+)	(+)	(+)
	Tiempo-días	(4)	(3)	(4)
	Tamaño relativo	grandes	pequeñas	pequeñas
	Número relativo	abundantes	abundantes	escaso
B3	Crecimiento	(+)	(+)	(+)
	Tiempo-días	(4)	(3)	(4)
	Tamaño relativo	pequeñas	pequeñas	pequeñas
	Número relativo	abundante	abundante	escaso
B4	Crecimiento	(+)	(+)	(-)
	Tiempo-días	(5)	(5)	(7)
	Tamaño relativo	pequeño	pequeño	-
	Número relativo	escaso	escaso	-

CUADRO No 7 (cont.)

EVALUACION DEL CRECIMIENTO DE MICOPLASMA AL AISLAMIENTO PRIMARIO EN
DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO

B5	Crecimiento	(+)	(+)	(+)
	Tiempo-días	(4)	(3)	(4)
	Tamaño relativo	pequeñas	pequeñas	pequeñas
	Número relativo	abundantes	abundantes	escaso
B6	Crecimiento	(+)	(+)	(-)
	Tiempo-días	(4)	(3)	(7)
	Tamaño relativo	pequeñas	pequeñas	-
	Número relativo	abundantes	abundantes	-
B7	Crecimiento	(+)	(+)	(-)
	Tiempo-días	(4)	(4)	(7)
	Tamaño relativo	pequeñas	pequeñas	-
	Número relativo	escaso	escaso	-
B8	Crecimiento	(+)	(+)	(+)
	Tiempo-días	(4)	(3)	(4)
	Tamaño relativo	pequeñas	pequeñas	pequeñas
	Número relativo	abundante	abundante	escaso

CUADRO No 8

RESULTADOS DE LOS CRECIMIENTOS OBTENIDOS
EN LA PRIMERA CLONACION

MUESTRA	MEDIOS	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8
III		-	-	-	-	+	-	-	+
IV		+	-	-	-	+	+	-	+
V		-	-	+	-	+	-	-	-

- : sin crecimiento

+ : con crecimiento

CUADRO No 9

RESULTADOS DE LOS CRECIMIENTOS
OBTENIDOS EN LA SEGUNDA CLONACION

MUESTRA	MEDIOS	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8
III		-	-	-	-	+	-	-	+
IV		-	-	-	-	-	-	-	+
V		-	-	-	-	-	-	-	-

- : sin crecimiento

+ : con crecimiento

Muestra III.- Se obtuvieron crecimientos positivos de los medios B5 y B8, estos fueron distribuidos en alícuotas de 0.2 ml para su liofilización.

Muestra IV.- Las colonias recuperadas del medio B8, no presentaron nuevamente crecimiento. Debido a ésto, fué necesario recuperar la cepa de los tubos congelados de la segunda clonación, sin embargo tampoco fué recuperada, se intentó con los tubos de la primera clonación con resultados similares. Por último fué rescatada de los tubos del primocultivo, específicamente del tubo B2-10⁻², ya que otros tubos sembrados no dieron resultados. Después fué clonada nuevamente utilizando para este fin el medio B8, se hizo el pase tres veces consecutivamente. Ya purificado fué subdividido para su liofilización.

Muestra V.- Esta cepa también tuvo que ser rescatada de los tubos del primocultivo, en este caso fué el medio B5-10⁻², se realizaron las tres clonaciones en el medio B8 hasta obtener un crecimiento puro. Fué distribuido en alícuotas para su liofilización.

3.- Temperatura óptima de conservación.

Se observó que las muestras conservadas en congelación a - 70 °C descongeladas 24 horas después, conservaban

la viabilidad y número de colonias que el presentado en el caldo original, a temperatura de refrigeración, el crecimiento era menor que el crecimiento original, y a temperatura ambiente, las cepas morían en 24 horas no pudiendo desarrollarse ninguna colonia. Estos resultados fueron idénticos en la muestra IV y V, muestra III no creció.

4.- Evaluación de tiempo óptimo de crecimiento.

Los resultados obtenidos se expresan en los cuadros número 10, 11, 12, 13, 14 y 15.

5.- Pruebas bioquímicas.

Conociendo los datos anteriores, se montaron las pruebas bioquímicas necesarias respetando el tiempo óptimo de crecimiento de cada cepa, sin embargo de 22 intentos, únicamente dos veces fué posible rescatar la muestra IV y V, con estos crecimientos fué posible evaluar las pruebas de filtrabilidad siendo positiva para ambas cepas, así como la siembra de las mismas en medio sin antibióticos en los cuales no hubo reversión bacteriana.

Estos crecimientos fueron conservados en congelación a -70°C así como mantenidos vivos mediante pases ciegos, sin embargo después de varios pases murieron. La muestra III nunca pudo ser rescatada.

Se pensó que probablemente las cepas requerían de medios más enriquecidos como el medio de Friis el cual es utilizado para el cultivo de micoplasmas de origen porcino, ó bien de factores que estimularán su crecimiento como el Tween 80 ó el Dinucleótido de adenina nicotinamida (NAD), ó de medios sin antibióticos ya que éstos pueden inhibir el crecimiento de algunos micoplasmas, sin embargo a pesar de haber realizado todas estas posibilidades sobre las cepas, sólo el medio de Friis favoreció su crecimiento aunque a los subcultivos las tres cepas murieron (2,5,11,19,21,22,23,32,35,40).

Debido a lo anteriormente expuesto, se decidió abrir todas las ampolletas liofilizadas aún existentes y sembrarlas en un medio líquido de Hayflick, de manera similar a las veces anteriores, las cepas crecieron debilmente y a pesar de presentar crecimiento, el número de colonias fué muy escaso (2-4 colonias por caja), se montaron las pruebas con esos tubos crecidos sin embargo, ninguna prueba pudo presentar una reacción franca por lo que se tuvo que terminar el trabajo.

CUADRO No 10

EVALUACION DEL CRECIMIENTO EN CALDO DE LAS TRES CEPAS DIFERENTES

MUESTRA	DIAS DE OBSERVACION								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
III (a)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
III (b)	-	-	-	-	d	+	++	+++	+++
IV (a)	-	-	-	-	-	d	+	++	+++
IV (b)	-	-	-	d	+	++	++	++	+++
V (a)	-	-	+	+	+	++	++	++	+++
V (b)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- : sin cambio aparente de pH
d : dudoso cambio de pH
+ : cambio ligero de pH
++ : cambio aparente de pH
+++ : cambio franco de pH

CUADRO No 11

EVALUACION DEL CRECIMIENTO DE MICOPLASMAS EN MEDIO SOLIDO A PARTIR
DE CULTIVOS LIQUIDOS DESPUES DE 48 HORAS DE INCUBACION

MUESTRA	D I A S D E O B S E R V A C I O N								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
III (a)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
III (b)	-	-	-	-	-	-	-	-	+
IV (a)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IV (b)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
V (a)	-	-	-	-	+	+	+	+	+
V (b)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- : sin observación de colonias

+ : desarrollo de colonias

CUADRO No 12

EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE MICOPLASMAS EN MEDIO SOLIDO A PARTIR
DE CULTIVOS LIQUIDOS DESPUES DE 72 HORAS DE INCUBACION

MUESTRA	D I A S D E O B S E R V A C I O N								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
III (a)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
III (b)	-	-	-	-	-	-	-	-	+
IV (a)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IV (b)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
V (a)	-	-	-	-	+	+	+	+	+
V (b)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- : sin observación de colonias
+ : desarrollo de colonias

CUADRO No 13

EVALUACION DEL CRECIMIENTO DE MICOPLASMAS EN MEDIO SOLIDO A PARTIR
DE CULTIVOS LIQUIDOS DESPUES DE 96 HORAS DE INCUBACION

MUESTRA	DIAS DE OBSERVACION								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
III (a)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
III (b)	-	-	-	-	+	+	+	+	+
IV (a)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IV (b)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
V (a)	-	-	+	+	+	+	+	+	+
V (b)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- : sin observación de colonias
+ : desarrollo de colonias

CUADRO No 14

EVALUACION DEL CRECIMIENTO DE MICOPLASMAS EN MEDIO SOLIDO A PARTIR
DE CULTIVOS LIQUIDOS DESPUES DE 120 HORAS DE INCUBACION

MUESTRA	D I A S D E O B S E R V A C I O N								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
III (a)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
III (b)	-	-	+	+	+	+	+	+	+
IV (a)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IV (b)	-	-	-	+	+	+	+	+	+
V (a)	-	-	+	+	+	+	+	+	+
V (b)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- : sin observación de colonias
+ : desarrollo de colonias

CUADRO No 15

EVALUACION DEL CRECIMIENTO DE MICOPLASMAS EN MEDIO SOLIDO A PARTIR
DE CULTIVOS LIQUIDOS DESPUES DE 144 HORAS DE INCUBACION

MUESTRA	DIAS DE OBSERVACION								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
III (a)	-	-	+	-	-	-	-	-	-
III (b)	-	-	-	-	-	+	+	+	+
IV (a)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IV (b)	-	-	-	-	-	+	+	+	+
V (a)	-	-	-	+	+	+	+	+	+
V (b)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- : sin observación de colonias
+ : desarrollo de colonias

DISCUSIÓN

Las lesiones observadas en los animales jóvenes muestreados, son similares a las reportadas por otros autores (4,28,34,38,42,43), a pesar de no haber presentado signos de conjuntivitis ó queratoconjuntivitis crónica, se ha reportado que los micoplasmas pueden ser aislados a partir de conjuntivitis agudas (4,28).

Aunque las causas etiológicas del complejo de Oftalmía contagiosa son varias, el trabajo no contempló la identificación de Rickettsia y Chlamydia debido a que se careció de los medios y las pruebas para realizar su diagnóstico, no obstante en la búsqueda de otros agentes el aislamiento de Neisseria ovis en este trabajo coincide con lo publicado por diversos autores (28,41), observándose que su presencia en las cinco muestras indica que juega un papel importante en el desarrollo de esta enfermedad no obstante existir datos que indican que ésta puede ser obtenida a partir de animales sanos y enfermos (30).

Los micoplasmas intervienen de manera importante en el complejo ya que de las cinco muestras, tres obtuvieron crecimientos positivos, lo cual es coincidente con lo reportado por otros autores (30).

Los hallazgos encontrados en los frotis teñidos con Giemsa indican posiblemente la existencia de micoplasmas en las muestras III, IV y V, no obstante que este dato es poco confiable, algunos autores obtuvieron resultados similares en sus observaciones en concordancia con sus aislamientos (30).

Respecto a la efectividad de los medios, fué posible observar que todos ellos fueron lo suficientemente ricos para favorecer el crecimiento de los micoplasmas testigos, así como los micoplasmas aislados, sin una ventaja apreciable de alguno de ellos sobre los demás.

Respecto a las cepas problema, hubo crecimiento - aparente en todos los medios en un lapso de 2-4 días tanto en el medio líquido como en el sólido a excepción del medio B4 - (adicionado con suero de ovino), el cual fué inapropiado para el crecimiento de las cepas; este resultado es similar al reportado por Spradbrow (41).

En cuanto a los crecimientos, fué fácilmente observable que entre más diluída se encontraba la muestra, más tardado era el crecimiento.

El desarrollo de las colonias en medio sólido no

dependió de los componentes del medio ya que la cantidad y - tamaño de las colonias estuvieron relacionadas con el número de micoplasmas presentes en las muestras como se observó en la muestra V; la cual siempre presentó escaso crecimiento así como un desarrollo más lento; no así en las otras muestras.

En cuanto a las clonaciones, se puede observar que en el primocultivo todos los medios favorecieron los crecimientos, no obstante cada paso realizado en la purificación de las cepas era demeritorio para su crecimiento; esto se pudo observar desde la primer clonación en donde sólo cinco medios favorecieron el crecimiento a pesar de haber sido suplementados con extractos de tejidos según sugerencias de algunos autores (25,41).

Algunos autores han obtenido resultados similares, Spradbrow (41) reporta haber crecido primocultivos, sin embargo no pudo recuperar las cepas a pesar de haber suplementado sus medios con lágrimas ó suero de ovino; de igual manera - otros investigadores (5) tampoco encontraron ventajas al adicionar con factores que favorecieran el crecimiento. Mc Cauley (34) logró obtener sólo dos colonias a partir de una muestra, sin embargo el autor supone que esta situación fué debida por haber tratado a los animales con antibióticos.

Barile (5) encontró que las colonias con bajos pasajes eran -
pequeñas y era necesario adaptarlas a condiciones de laborato-
rio mediante pases ciegos, no obstante reporta haber tenido -
problemas en la adaptación de sus cepas; por otro lado Langford
(30) piensa que dicho proceso no favorece la recuperación de
los microorganismos y que es más recomendable aumentar el tiem-
po de incubación. En contraposición Baas (4), a pesar de haber
incubado durante tres semanas, reporta que algunos cultivos
nunca se adaptaron al laboratorio; sin embargo algunos autores
lograron la adaptabilidad de las cepas sin aparente contratiem-
po incluyendo diez pases para la purificación (30).

El presente trabajo indica que en el caso de estas
cepas, a pesar de haber incubado por tres semanas, ó haber rea-
lizado pases ciegos, ó suplementar los medios, los resultados
fueron negativos, y puede ser que aún queden otros factores por
considerar para lograr los crecimientos sin contratiempo; y se
comprobó que como menciona Hayflick, el 70 % de las cepas ais-
ladas no pueden ser subcultivadas a pesar de realizar lo reco-
mendado en la literatura (16,37,41).

Todas estas experiencias pueden deberse a muchas va-
riables fuera de control, pues se asocian directamente al tipo
de cultivo como puede ser la adaptabilidad propia de la cepa,

pases ciegos que pueden favorecer posibles mutantes u otros cambios en el genoma (18), un medio no suficientemente rico (31), trabajar con cepas en fase de crecimiento decreciente, ya que se ha observado que cepas no transferidas a un medio fresco al segundo o tercer día de incubación pierden viabilidad e incluso mueren (1).

Otros autores reportan que los microorganismos cultivados en medios líquidos no soportan más de dos pases posteriores a la descongelación (34, 41).

A pesar de que las tres cepas pudieron purificarse, esto afectó drásticamente su viabilidad, sin embargo fué necesario conservarlas en liofilización, no obstante de conocer que este proceso deteriora en un 90% la recuperación del crecimiento preexistente ántes del proceso (1). Sin embargo a pesar de esta situación, fue posible crecer las cepas, sólo que éstas se comportaban inconstantes respecto a su crecimiento, no así las cepas testigo utilizadas las cuales ya se encontraban adaptadas a las condiciones de laboratorio.

Concluyendo se puede afirmar que la Oftalmía puede ser ocasionada por micoplasmas y otros microorganismos (Neisseria ovis), siendo este problema detectado en México según demuestra el presente trabajo. La prueba de filtrabilidad realizada,

así como la ausencia de reversión bacteriana son datos que apoyan que las cepas aisladas en este trabajo pertenecían a la clase Mollicutes, sin poder afirmarse que estas cepas pertenecen al género Acholeplasma o Mycoplasma. Todo esto indica que es necesario estudiar aún más sobre el cultivo de los micoplasmas así como técnicas nuevas y menos laboriosas que puedan facilitar el diagnóstico e identificación de los mismos.

Es necesario seguir instrumentando estos aspectos de diagnóstico, ya que sin el aislamiento del microorganismo, no es posible realizar pruebas de laboratorio que arrojen datos sobre la incidencia y prevalencia de ésta enfermedad en una determinada región, que en algún momento dado son datos importantes para llevar a cabo un buen programa de control.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Addey, J.P., Robinson, T.: Viability of *Mycoplasma* after storage in frozen or lyophilised states. *J. Med. Microbiol.*, 3: 137-145 (1970).
- 2.- Adler, H.E., Da Massa, A.J., Field, S.W.: Factors influencing growth of *Mycoplasma synoviae*. *Avian Dis.* 18: 568-577 (1974).
- 3.- Aluotto, B.D., Wittler, R.G.: Standardized techniques for the characterization of *Mycoplasmas* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 20: 35-58 (1970).
- 4.- Baas, E.J., Trottes, S.L., Francklin, R.M. and Barile, M.F.: Epidemic caprine keratoconjunctivitis: Recovery of *Mycoplasma conjunctivae* and its role in pathogenesis. *Infect. Immun.*, 18: 806-815 (1977).
- 5.- Barile, M.F., Guidice, R.A. and Tully, J.G.: Isolation and characterization of *Mycoplasma conjunctivae* sp.n. from sheep and goats with keratoconjunctivitis. *Infect. Immun.* 5: 70-76 (1972).

- 6.- Barile, M.F.: General principles of isolation and detection of mycoplasmas. In: Mycoplasmas of man, animals, plants and insects. Bové, J.M. and Duplan, J.F. (ed). Congress Bordeaux France. INSERM, Paris, 1974.
- 7.- Blackburn, B.O.: Biochemical test. In: Laboratory diagnosis of micoplasmosis in food animal. Stalheim, O.H. (ed). The American Association of Veterinary laboratory Diagnosticians. Madison, Winsconsin, 1976.
- 8.- Buxton, A. , Fraser, G.: Animal Microbiology. Vol 1. Blackwell Scientific publications, Edinburgh, 1977.
- 9.- Carter, G.R.: Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology. 3th ed. Thomas publisher, Springfield, Illinois, 1979.
- 10.- Cottew, G.S.: Characterization of Mycoplasma isolated from sheep with pneumonia. Aust.Vet. J., 47: 591-597 (1971).
- 11.- Cottew, G.S.: The mycoplasmas of sheep and goats. In: Mycoplasmas of man, animals, plants and insects. Bové, J.M. and Duplan, J.F. (ed). Congress Bordeaux, France. INSERM, Paris, 1974.

- 12.- Cottew, G.S.: Occurrence of Mycoplasma in clinically normal goats. Aust. Vet. J., 57: 52-53 (1981).

- 13.- Cowan, S.T.: Manual for the identification of medical bacteria. 2nd ed. Cambridge University Press, London, 1974.

- 14.- Cruickshank, R., Duguid, B.P., Marmion, R.H., Suisin, A.: Medical microbiology, 12th ed. Churchill Livingstone, Edinburgh, London, 1975.

- 15.- Davis, B.D., Dulbecco, R.: Tratado de microbiología. Salvat, Barcelona, 1976.

- 16.- Edward, D.G.: Taxonomy of class Mollicutes. In: Mycoplasmas of man, animals, plants and insects. Bové, J.M. and Duplan J.F. (ed). Congress Bordeaux, France. INSERM, Paris, 1974.

- 17.- Ernø, H., Al Aubaidi, J.M.: Classification and identification of ovine and caprine mycoplasmas. Act.Vet. Scand., 19: 392-406 (1978).

- 18.- Fabricant, J. and Freund, E.A.: Importance of extension and standardization of laboratory test for the identification and classification of Mycoplasma. Ann. N.Y. Acad. Sci., 143: 50-58 (1967).

- 19.- Finn, T.B.: Human T-mycoplasmas (Ureaplasma urealitycum)
Tesis doctoral. Instituto de Microbiología Médica Univer-
sidad de Aarhus, Aarhus, Dinamarca, 1974.
- 20.- Freeman, B.A.: Tratado de Microbiología de Burrows. 2la ed.
Nueva editorial Interamericana, México, 1983.
- 21.- Friis, N.F.: A selective medium for Mycoplasma suipneumoniae
Acta. Vet. Scand. 12: 454-456 (1971).
- 22.- Friis, N.F.: Isolation and characterization of a new porcine
mycoplasma. Acta. Vet. Scand., 13: 284-286 (1972).
- 23.- Friis, N.F.: Mycoplasmas in pigs (with special regard to
the respiratory tract). Commissioned by Royal Veterinary
and Agricultural University. Copenhagen, 1974.
- 24.- Friis, N.F. and Pedersen, K.B.: Isolation of Mycoplasma
bovoculi from cases of infection bovine keratoconjunctivitis.
Acta. Vet. Scand., 20: 51-59 (1979).
- 25.- Hayflick, L.: Mycoplasmas as pathogens. In: Pathogenic
Mycoplasmas. Ciba foundation symposium. Elsevier, Amsterdam,
1972.

- 26.- Hudson, J.R. and Cottew, G.S.: Diseases of goats caused by Mycoplasmas: A review of the subject with some new findings. Ann. N.Y. Acad. Sci. 143: 287-297 (1976).
- 27.- Jawetz, E., Melnick, J. and Adelberg, E.: Microbiología Médica. 9a ed. Manual Moderno, México. 1983.
- 28.- Jones, G.E., Foggie, A and Sutherland, A.: Mycoplasmas and ovine keratoconjunctivitis. Vet.Rec., 99: 137-141 (1976)
- 29.- Jubb, K.V., Kennedy, P.C.: Pathology of domestic animals. 2nd ed. Academic Press. Vol II, New York, 1970.
- 30.- Langford, E.V.: Mycoplasma associated bacteria isolated from ovine pink eye. Can. J. Comp. Med., 35: 18-21 (1971).
- 31.- Langford, E.V.: Laboratory procedures and mediums for the isolation of mycoplasmas from clinical material. In : Laboratory diagnosis of micoplasmosis in food animal. Stalheim, O.H., (ed). The American Association of Veterinary laboratory Diagnosticians. Madison, Winsconsin, 1976.
- 32.- Livinstong, C.W. and Gauer, B.B.: Ureaplasma and diseases of rumiants. In: Laboratory diagnosis of micoplasmosis in food animal. The American Association of Veterinary laboratory Diagnosticians. Madison, Winsconsin, 1976.

- 33.- Lopez, J. y Barajas, J.: Manual de laboratorio para bacteriología y micología veterinaria. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 1981.
- 34.- Mc Cauley, E.H. and Surman, P.G.: Isolation of Mycoplasma from goats during an epizootic of keratoconjunctivitis. Am. J. Vet. Res., 32: 861-870 (1971).
- 35.- Mc Coy, R.E., Basham, H.G., Tully, J.G. and Rose, D.L : Acholeplasma florum a new species isolated from plants. Int. J. Syst. Bacteriol., 34: 11-15 (1984)
- 36.- Paul, J.: Cell and tissue culture. 4th ed. E & S Livingstone, Edinburgh, 1970.
- 37.- Pugh, G.W., Hughes, E.D. and Schulz, V.D.: Infection bovine keratoconjunctivitis: Experimental induction in calves with Mycoplasma and Moraxella bovis. Am.J. Vet. Res., 37: 493-495 (1976).
- 38.- Pugh, G.W.: Mycoplasmas and conjunctivitis. In: Laboratory diagnosis of micoplasmosis in food animal. Stalheim, O.H., (ed). The American Association of Veterinary laboratory Diagnosticians. Madison, Winsconsin, 1976.

- 39.- Rosenbush, R.F. and Knidston, W.: Bovine mycoplasmal conjunctivitis: Experimental reproduction and characterization of the disease. *Cornell Vet.* 70: 307-320 (1980).
- 40.- Shepard, M.C.: Cultivation and properties of T-strains of mycoplasmas associated with nongonococcal urethritis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 143: 505-514 (1967)
- 41.- Spradbrow, P.B. and Marley, J.B.: Ovine keratoconjunctivitis: Possible T-strain mycoplasma in the conjunctival sac. *Aust. Vet. J.* 47: 116-118 (1971).
- 42.- Trotter, S.L. and Francklin, R.M.: Epidemic caprine keratoconjunctivitis: Experimentally induced disease with a pure culture of M. conjunctivae. *Infect. Immun.* 18: 816-822 (1977).
- 43.- Tully, J.G. and Whithom, R.F.: The mycoplasmas II. Human and animal mycoplasma. Academic Press, New York, 1979.
- 44.- Tully, J.G. and Bové, J.M.: Introduction. In: International organization for Mycoplasmaology (Mycoplasma techniques course). Tully, J.G. (ed). Organized by University of Bordeaux, France. I.O.M.; Paris, 1983.

- 45.- Tully, J.G.: Composition and preparation of Mycoplasma culture media. In: International organization for Mycoplasma (Mycoplasma techniques course). Tully, J.G.(ed). Organized by University of Bordeaux, France. I.O.M., Paris, 1983.
- 46.- Tully, J.G.: Filtration characteristics of mycoplasma. In: International organization for mycoplasma (Mycoplasma techniques course). Tully, J.G. (ed). Organized by University of Bordeaux, France. I.O.M., Paris, 1983.
- 47.- Whittleslone, P.: Isolation techniques for mycoplasmas from animal disease. In: Mycoplasmas of man, animals, plants, and insects. Bové, J.M. and Duplan, J.F.(ed). Congress Bordeaux, France. INSERM, Paris, 1974.