



26
2019
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

AI SLAM I EN TO Y CA RA CTE RI ZA CI ON DE MI CO PLAS MAS
O BT EN I DOS DE PU LM ONES NE UM ON I COS DE CA BRAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

LAURA JARAMILLO MEZA

DIRECTOR DE TESIS:

M.V.Z., M. EN C., DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1987



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 está 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.

I N D I C E

Resumen.	1
I. Introducción.	1
A. Antecedentes.	1
B. Generalidades sobre los micoplasmas.	7
1. Historia.	7
2. Nomenclatura.	7
3. Características de los micoplasmas.	8
4. Morfología microscópica de los micoplasmas.	9
5. Ciclo de vida.	9
6. Ultraestructura.	10
7. Diferencias entre las formas "L" y los micoplasmas.	11
8. Requerimientos Químicos y Físicos para el crecimiento y desarrollo de micoplasmas.	11
9. Metabolismo.	14
10. Identificación de las especies de micoplasmas.	15
a. Inhibición de crecimiento e inhibición metabólica.	16
b. Empleo de la inmunofluorescencia para la identificación de micoplasmas.	17
C. Factores involucrados en la patogénesis de los micoplasmas.	18
1. Mimetismo biológico de los micoplasmas.	18
2. Hemolisinas.	18
3. Citopatogenicidad.	19
4. Interferencia con el metabolismo de las células de los tejidos.	20
D. Enfermedades de las cabras producidas por micoplasmas y que involucran al pulmón.	21
1. Descripción de la pleuroneumonía contagiosa caprina y especies relacionadas.	22
2. <u>Mycoplasma mycoides</u> var <u>mycoides</u>	27
a. Características bioquímicas de <u>M. mycoides</u> var <u>mycoides</u>	27
3. Micoplasmas relacionados con el grupo F-38	28
a. Características del grupo F-38	29
4. <u>Mycoplasma capricolum</u>	30
a. Características bioquímicas de <u>Mycoplasma capricolum</u>	31
5. <u>Mycoplasma agalactiae</u>	31

a. Características bioquímicas de <u>Mycoplasma agalactiae</u> .	32
6. <u>Mycoplasma ovipneumoniae</u> .	32
a. Características bioquímicas de <u>Mycoplasma ovipneumoniae</u> .	33
7. <u>Mycoplasma arginini</u> .	33
a. Características bioquímicas de <u>Mycoplasma arginini</u> .	34
II. Objetivo.	36
III. Material y Métodos.	37
A. Obtención de muestras.	37
B. Estudio bacteriológico.	37
1. Medios de cultivo.	37
2. Tratamiento de las Muestras para el Estudio Bacteriológico.	38
C. Estudio histopatológico.	38
D. Aislamiento de micoplasmas	
1. Medios de cultivo para micoplasmas.	38
2. Medios para caracterización bioquímica de los micoplasmas	41
3. Tinción de dienes para identificación de colonias de micoplasmas.	42
4. Procedimiento para el aislamiento y cultivo de micoplasmas	43
a. Purificación de los aislamientos de micoplasmas por clonación.	43
b. Prueba de dependencia de esteroides	44
c. Pruebas de fermentación de carbohidratos	44
d. Pruebas de hidrólisis de aminoácidos.	45
e. Formación de película y manchas	45
f. Producción de Péroxido de Hidrógeno.	46
5. Preparación de antígenos y antisueros	47
a. Preparación del antígeno inmunizante.	47
a.1. Preparación del inóculo.	47
b. Producción de antisuero.	48
6. Procedimiento para la prueba de inhibición de crecimiento.	48
7. Procedimiento para la prueba de inmunofluorescencia indirecta.	50
8. Análisis estadístico.	52
IV. Resultados.	
A. Estudio Patológico e Histológico.	54
B. Estudio Bacteriológico.	55
C. Aislamiento de Micoplasmas	58

1. Identificación de los aislamientos de micoplasmas. - - - - -	58
V. Discusión - - - - -	70
VI. Conclusiones - - - - -	75
VII. Bibliografía - - - - -	76

R E S U M E N

La cabra es un importante animal de explotación ganadera y los problemas respiratorios representan una de sus principales enfermedades. Dentro del proceso neumónico se menciona la participación de los micoplasmas como organismos intermedios; sin embargo, la información nacional sobre las especies de micoplasmas que están involucradas dentro de los procesos neumónicos caprinos es muy pobre. Debido a ello, el objetivo de este trabajo fue aislar e identificar las especies de micoplasmas recuperadas de muestras de pulmones neumónicos, de cabras sacrificadas a nivel de rastro y correlacionar el análisis histopatológico y las especies bacterianas aisladas con los aislamientos de micoplasmas, con el intento de comprender mejor la interacción de los diferentes agentes participantes en la etiología y patogenia del proceso neumónico caprino.

Se colectaron 286 muestras de pulmones de cabras de los rastros de Capulhuac, Edo de Méx y Milpa Alta, D.F. 68 fueron considerados como neumónicos de acuerdo con el examen histopatológico y las 218 muestras restantes como normales o con cambios leves e inespecíficos. Las lesiones que se observaron en la mayor parte de los pulmones neumónicos eran áreas de consolidación roja-gris localizadas en los lóbulos pulmonares craneoventrales. El análisis histopatológico practicado a las 68 muestras de pulmones neumónicos mostró diferentes tipos de neumonías de las cuales las neumonías exudativas, mixtas, proliferativas y abscedativas fueron las más frecuentes. Se aisló una gran variedad de géneros bacterianos tanto de pulmones neumónicos como de pulmones normales. Sin embargo, el análisis estadístico de χ^2 mostró que los aislamientos de Escherichia coli, Branhamella -

ovis, Pasteurella multocida, Pasteurella haemolytica, Corynebacterium ovis y micoplasmas de pulmones neumónicos era significativo. Se obtuvieron un total de 27 aislamientos de micoplasmas tanto de pulmones neumónicos como de pulmones normales. Once de estos aislamientos pertenecieron a las 68 muestras de pulmones neumónicos (17.6%) y 16 a las muestras de pulmones normales (7.3%). Se realizaron clonaciones con cada uno de los aislamientos de micoplasmas para posteriormente efectuarseles la prueba de dependencia de esteroides que indicó que todos los aislamientos pertenecían al género Mycoplasma. Todas las cepas de micoplasmas aisladas presentaban características bioquímicas en común, como fueron: incapacidad para fermentar glucosa e hidrolizar la arginina, productoras de película y manchas y productoras de peróxido de hidrógeno. Las pruebas serológicas de inhibición de crecimiento e inmunofluorescencia mostraron que había relación serológica entre los aislamientos y la cepa de referencia de M. caprino del grupo 7 de Al-Aubaidi. Sin embargo, se observaron características bioquímicas en los aislamientos que no se observaron ni han sido reportadas para el M. caprino del grupo 7. Bioquímicamente los aislamientos mostraron estar más relacionados con M. agalactiae pero no se pudo demostrar si existía o no relación serológica entre los aislamientos y esta especie de micoplasma. Se ha considerado que la producción de peróxido de hidrógeno es un factor involucrado en la patogénesis de los micoplasmas y este factor se encontró en todos los aislamientos obtenidos lo cual indica que estos micoplasmas realmente podrían estar involucrados dentro del proceso neumónico caprino, además, éstos fueron aislados de diferentes tipos de neumonías lo cual sugiere que estos microorganismos podrían estar actuando como agentes desencadenantes del proceso neumónico y que es necesario investigar más al respecto para determinar el papel exacto que juegan los micoplasmas dentro de estos procesos.

I. INTRODUCCION.

A.1. ANTECEDENTES.

El pulmón tiene un eficiente sistema de defensa y puede eliminar prácticamente todas las partículas, menos las de menor tamaño, por mecanismos no específicos que involucran a la filtración aerodinámica, cambios bruscos en la dirección del árbol respiratorio, y el desplazamiento del moco impulsado por el movimiento ciliar, al cual pueden adherirse las partículas y ser eliminadas hacia los orificios naturales (121).

El depósito de partículas en diferentes partes del árbol respiratorio depende fundamentalmente del tamaño de éstas. Las partículas de más de 10 μ m se depositan en los cornetes nasales por su fuerza de inercia; al descender por el árbol respiratorio, la velocidad de flujo de aire desciende obligando a la sedimentación por gravedad de partículas de 10 - 2 μ m en el epitelio traqueobronquial. Las partículas de 0.5 μ m no se depositan y se retiran con la espiración las partículas con diámetros entre 0.5 μ m y 2 μ m pueden franquear los mecanismos de defensa específicos e inespecíficos del aparato respiratorio superior y logran llegar hasta la pared del alveolo, por ejemplo las bacterias (53).

Sin embargo existen otros mecanismos de defensa que actúan a nivel alveolar y son capaces de inactivar a las bacterias. El principal responsable de esta inactivación es el macrófago alveolar, pero existen otras sustancias que ayudan a la protección del tejido pulmonar, entre ellas se encuentran a las inmunoglobulinas, lisozima, transferrina, interferon, antitripsina y complemento (54) (121); pero también existen factores o condiciones que afectan la eliminación bacteriana respiratoria. Entre estos factores se mencionan a las temperaturas bajas, humedad alta relativa, situaciones de estrés y concentraciones altas de gases como el amoníaco, el sulfuro de hidrógeno y el dióxido de carbono (76).

La infección viral, es otro de los factores que también afecta la eliminación bacteriana, debido a que diversos virus son capaces de deprimir las defensas pulmonares favoreciendo la infección o colonización bacteriana.

Por lo que se ha considerado que muchos de los problemas respiratorios son resultado de la interacción secuencial de factores ambientales - agentes virales-organismos intermedios y bacterias (90).

Este complejo respiratorio es un proceso infecto-contagioso que - afecta fundamentalmente a animales jóvenes y puede presentarse en forma ina parente o con signos leves de bronconeumonía en los adultos dejando como secuela una población deteriorada físicamente; ocasionando, además, retraso en el crecimiento en aquellos animales afectados crónicamente. En éstos, - la lesión crónica representa un proceso secundario ya que la primoinfección generalmente viral, ha sido reemplazada por el proceso bacteriano secundario (89).

El papel que juegan las bacterias en el proceso neumónico por mu chos años estuvo sin esclarecerse completamente, a pesar de que ciertas bac terias podían aislarse con regularidad de pulmones neumónicos ya que estas no eran capaces por sí solas en condiciones experimentales de causar la enfermedad, y no fue hasta que, la idea de complejo neumónico de etiología - múltiple y secuencial quedó establecida, que se comenzó a comprender a las bacterias en su papel de invasores secundarios, incapaces por un lado de pro ducir la enfermedad por sí solas y responsables por el otro lado de las lesiones graves del complejo neumónico (90).

Los organismos intermedios en estos procesos neumónicos están representados principalmente por el género Mycoplasma (90), este tipo de enfermedades ocasiona a la industria caprina graves pérdidas económicas en - nuestro país, donde se ha reportado una incidencia de neumonías del 10.4% en cabras sacrificadas a nivel de rastro (91).

A pesar de que una gran diversidad de especies de *Mycoplasma* se han aislado de cabras, la información sobre muchos de los aislamientos es particularmente confusa ya que no existe un acuerdo general acerca de la clasificación de muchos de éstos (47).

La literatura pasada llegó a crear gran confusión entre la pleuroneumonía contagiosa caprina (PCC) causada por *Mycoplasma mycoides* var *capri* y la producida por otras especies de micoplasmas, como: *Mycoplasma mycoides* var *mycoides* tipo colonias grandes, *M. capricolum* y la cepa de *Mycoplasma* F-38 (1)(88)(70).

Las especies anteriormente citadas causan enfermedades que toman principalmente un curso agudo y ocasionan elevados índices de morbilidad y mortalidad (84). Estas han sido reportadas principalmente en Asia, Africa y Europa (104)(85) en Norteamérica (86) y México (112).

En México las lesiones de la pleuroneumonía contagiosa caprina fueron descritas en el año de 1964 por Aluja y col (5). Tres años después Solana y Rivera Cruz aislaron *Mycoplasma mycoides* var *capri* de cabras que presentaban las mismas lesiones (112). Un estudio seroepizootiológico sobre la enfermedad reveló de un 12 a un 79% de positividad en varios estados de la República Mexicana (113).

Mycoplasma agalactiae, causante del síndrome de la agalactia contagiosa de ovinos y caprinos causa predominantemente mastitis pero además induce artritis, queratoconjuntivitis, pleuresía y vulvovaginitis (30)(105) con una mortalidad que puede alcanzar hasta el 15%(37). Esta infección se ha reportado principalmente en ciudades del Mediterraneo (29).

Informes recientes de Francia, España e Israel han involucrado a *M. mycoides* var *mycoides* tipo colonias grandes y a *M. capricolum* con una enfermedad similar a la agalactia contagiosa (88)(87)(13).

M. ovipneumoniae se ha aislado del aparato respiratorio de ovinos con neumonía proliferativa intersticial crónica; se le considera como un agente predisponente a la infección por bacterias principalmente Pasteurella haemolytica (73). Esta especie de micoplasma ha sido aislada de pulmones neumónicos de cabras en México, Australia y Estados Unidos (24)(21)(114).

M. arginini ha sido aislado de pulmones neumónicos de ovinos y caprinos pero su papel en la etiología de la enfermedad es incierta, considerándosele hasta ahora como un organismo poco patógeno o bien como probablemente inocuo (60).

En México, Ciprian realizó un estudio de aislamiento y caracterización de micoplasmas recuperados de pulmones neumónicos de ovinos y caprinos en el cual se aislaron 7 cepas de M. arginini, 2 cepas de M. ovipneumoniae y 4 cepas no caracterizadas designadas como Mycoplasma s.p. a partir de 120 pulmones neumónicos de cabra que presentaban áreas de consolidación gris-rojiza (24).

Otras especies aisladas de cabras son M. putrefaciens, M. conjunctivae, Acholeplasma laidlawii, A. oculi, cepas de Ureaplasmas y los grupos 5 y 7 de Al-Aubaidi y los grupos 17 y 18 de Cottew (12)(46) (Cuadro I)

Las especies anteriormente descritas pueden encontrarse como comensales en animales clínicamente sanos a nivel de senos nasales, tonsilas y tracto genito urinario (61). Se ha demostrado que M. agalactiae, M. capricolum, M. mycoides var mycoides tipo colonias grandes y M. putrefaciens pueden aislarse del canal auditivo de las cabras y frecuentemente también del oído medio. Estos animales probablemente no son serológicamente positivos y por lo tanto constituyen un elevado riesgo de difusión de micoplasmas cuando son introducidos a otros hastos (32)(59)

C U A D R O NO. 1

Micoplasmas de borregos y cabras: Sitios de infección, Patogenicidad y distribución geográfica de las especies más importantes

Especies de Mycoplasma o Actinopteras	Huesped más común	Sitio infectado otros	Enfermedad con la que se asocia	Patogenicidad	Países DONDE SE reporta
M. agalactiae	B, C	Ubre artículo, ojo, pulmón, tracto urogenital	Agalactia, artritis, queratoconjuntivitis, neumonía, vulvovaginitis	P	Francia, Grecia, Italia, Portugal, España, E. U. A., Cd. de Asia y Norte de Africa
M. arginini	B, C y otros	A. Res. tracto urogenital, ojo, articulación	Neumonía, queratoconjuntivitis, artritis, vulvovaginitis	D	Mundial
M. capricolum	B, C	Articulaciones Ubre, pulmón, Ap. urogenital, órganos internos por septicemia	Artritis, mastitis y neumonía	P	Australia, Francia, E. U. A., España, Reino Unido
Grupo F-38	C	A. Res. Organos internos debido a septicemia	P. P. C. C.	P	Kenia, Sudan
M. mycoides var capri	C	A. Res. Articulaciones	P. P. C. C.	P	Africa, Asia, Australia
M. mycoides var mycoides (tipo coltona grande)	C raramente B y Bov.	A. Res. Ubre, ojos, articulaciones	P. P. C. C. mas artritis, mictoplasmaemia	P	Francia, Grecia, Italia, Portugal, España, Asia, Africa

<u>M. mycoides</u> var <u>mycoides</u> (tipo col. pequeña)	A. Res.	Articulaciones	Enf. parecida a la P.P.C.C. poli-artritis	D	Africa, Nueva Guinea
<u>M. ovipneumoniae</u>	B, C	A. Res.	tracto urogenital, ojos	P. E.	Mundial
<u>Acholeplasma laidlawii</u>	varios	T. urogenital	A. Res.	N. P.	Mundial
<u>A. oculi</u>	B, C, Bo vinos	Ojos	tracto urogenital, pulmones	P. E.	EU., Reino U. India, Japón.
ureaplasmas	B, C	T. urogenital	raro en A. Res	P. E.	Mundial

Jones, G. E. 1983 (59)

- B = Borregos
- C = Cabras
- Bo = Bovinos
- PPCC = Pleuropneumonia contagiosa caprina
- P = Patogenicidad
- D = Duda de patogenicidad
- P. E. = Patogenicidad demostrada experimentalmente
- N. P. = No patógeno
- A. Res. = Aparato respiratorio

B. GENERALIDADES SOBRE LOS MICOPLASMAS.

1. HISTORIA.

Nocard y col (81) en 1898 fueron los primeros en aislar organismos del grupo micoplasma en medios libres de células a partir de exudados de bovinos que murieron de pleuroneumonía contagiosa bovina (PCB); al organismo aislado se le conoce actualmente como Mycoplasma mycoides var mycoides. Veinticinco años después Bridré y Donatien aislaron M. agalactiae el agente causal de la agalactia contagiosa de borregos y cabras (20). Debido a la estrecha semejanza entre este organismo y el de la pleuroneumonía contagiosa bovina se les designan con el nombre de PPLO (Pleuroneumonía - Like Organism).

2. NOMENCLATURA.

El primer nombre dado al organismo de la PCB fue Asterococcus mycoides dado por Borrel en 1910 (16). Sin embargo, el nombre fue inadecuado debido al homónimo con el género algal Asterococcus. En 1955 se sugieren los nombres de Mycoplasma (80) y Borrelomyces (122). Edward y Freundt en 1956 proponen el uso de Mycoplasma como nombre genérico sobre las bases de prioridad y uso general (44). El nombre Mycoplasma significa forma filamentosa que describe las formas pleomórficas observadas en estos microorganismos.

Debido a las diferencias fundamentales entre micoplasmas y la clase Schizomycetes se establece la clase Mollicutes para el orden de los Mycoplasmatales que es paralelo pero distinto de la clase Schizomycetes (45).

3. CARACTERISTICAS DE LOS MICOPLASMAS.

Los micoplasmas son los organismos de vida libre más pequeños que se conocen, se multiplican en medios libres de células, aunque muchas especies requieran de medios complejos enriquecidos con suero para su desarrollo.

Los micoplasmas difieren de los virus y rickettsias en que no necesitan de células vivas para su desarrollo; y de las bacterias en que no presentan una pared celular. Esta carencia explica las formas pleomórficas de estos microorganismos así como su plasticidad (47)

La plasticidad de estos microorganismos les permite penetrar en los espacios de la red fibrilar del gel de agar lo que da como resultado la apariencia de "huevo frito" de las colonias cuando se observan con luz transmitida (93).

Las colonias de micoplasmas varían en tamaño desde 10 a 20 μ m en diámetro para las cepas-T (T=Tiny=pequeño), hasta 600 μ m para algunas especies. Debido a su tamaño las colonias de micoplasmas pueden verse usando aumentos de baja resolución (25 X), las colonias de cepas-T pueden verse usando una resolución mayor (100 X) (47).

4. MORFOLOGIA MICROSCOPICA DE LOS MICOPLASMAS

La carencia de pared celular les confiere formas redondeadas, ovatas, vesiculares, discoidales (40)(65), además se observan formas pequeñísimas, los granulos o corpúsculos elementales que llegan a medir 125 nm en diámetro (caen dentro del rango de los virus)

Debido al pequeño tamaño de los cuerpos elementales y también a la plasticidad de las formas más grandes, éstos pueden pasar a través de filtros que retienen bacterias. Esto condujo en muchas ocasiones a confundir a los micoplasmas con los virus.

La morfología de las formas elementales esta influenciada por: la edad de las células, el medio en que se han cultivado y por las mismas especies examinadas. Las formas filamentosas predominan en cultivos juvenes, mientras que los elementos granulares y esféricos se observan en cultivos líquidos viejos y en medios sólidos (47)

5. CICLO DE VIDA

Los mecanismos reproductivos de los micoplasmas son aún tema de debate, una escuela sostiene que los corpúsculos elementales esféricos o elongados de 0.1 a 0.3 μ m de diámetro se multiplican por división o extrusión de una prolongación corta y delgada que da lugar a un nuevo granulo. Esta forma puede desarrollarse con la edad en una gran forma redondeada o en una forma poligonal de 0.3 a 1 μ m de tamaño, de la que surgen granulos a partir de multiples centros de crecimiento de un solo organismo, los cuales se disgregan hasta que exista un cambio en las condiciones ambientales (39). La otra escuela sostiene que los filamentos no septados e-

ventualmente se transforman en largas cadenas de pequeños cuerpos vesiculares, regularmente espaciados y formados uniformemente

6. ULTRAESTRUCTURA

La ultraestructura de un corpúsculo elemental se ha determinado en cultivos de diferentes especies, como: M. gallisepticum, M. hominis con ayuda del microscopio electrónico, de la ultracentrifugación y del análisis químico, observándose las siguientes estructuras.

Una membrana trilaminar que varía de 75 a 110 Å de grosor compuesta de dos zonas externas electrodensas que miden de 20 a 30 Å compuestas principalmente de proteínas y una zona interna de 30 a 35 Å menos densa -- compuesta de lípidos (41). Las proteínas y los lípidos de la membrana se encuentran combinados con otros compuestos principalmente carbohidratos -- confiriéndoles a los micoplasmas propiedades hemoaglutinantes y patogenicidad (8)

Se han observado varios elementos organizados dentro del citoplasma. El material nuclear o DNA que no está limitado por una membrana nuclear y en el que se observan únicamente filamentos de DNA de cerca de 30 Å de diámetro dentro de una matrix granular (73). El tamaño del genoma en el género Mycoplasma es de cerca de 5×10^8 daltons, que es aproximadamente una quinta parte del de Escherichia coli (10); es el genoma más pequeño conocido en los procariotes de vida libre.

Los ribosomas pueden encontrarse dispuestos en un arreglo geométrico. En forma individual presentan un diámetro de 140 Å; los coeficientes de sedimentación son similares a los de los ribosomas de bacterias y levaduras (74). La relación RNA-proteína es de 60:40 igual que en células

procariotes.

7. Diferencias Entre Las Formas "L" y Los Micoplasmas

Las formas "L" bacterianas se definen como formas reproducibles, frágiles y filtrables, carentes de pared celular bacteriana. Estas surgen a partir de bacterias por la acción de varios agentes inductores, particularmente la penicilina (que es un componente en el medio de cultivo de los micoplasmas), enzimas y anticuerpos (77). Las colonias de micoplasmas pueden confundirse con las colonias de las formas "L", estas últimas tienden a tener un centro más oscuro que las colonias de micoplasma y su porción periférica es menos densa.

Las colonias sospechosas de micoplasma deben subcultivarse en medios libres de antibiótico así como en medios desprovistos de suero para que las colonias de las formas "L" reviertan a la forma bacteriana normal; o bien efectuar una tinción de Dienes específica para las colonias de micoplasma, ya que el riesgo de producir formas "L" estables se incrementa con el pasaje en presencia del inductor (47)

Las diferencias morfológicas entre micoplasmas y formas "L" no es tan bien definidas (40). Las membranas celulares de micoplasmas parecen ser más estables y elásticas que las membranas de protoplastos bacterianos, esto puede estar relacionado con la presencia de colesterol en la membrana micoplasmática (94). El cuadro 2 muestra las principales diferencias entre micoplasmas y formas "L".

8. Requerimientos Químicos y Físicos Para el Crecimiento y Desarrollo de Micoplasmas.

Cuadro No. 2

Diferencias entre Micoplasmas y Formas L bacterianas

Micoplasmas	Formas L
Ocurren en la naturaleza	Son artefactos de laboratorio, generalmente
Requieren esteroides (a excepción del género <i>Acholeplasma</i>)	No requieren de esteroides
No reversion a formas bacterianas si se crecen en medios libres de antibióticos	Reverten a la forma bacteriana cuando se retira el agente inductor (p.ej. <u>antibiotico</u>)
Actividad metabólica limitada	Presenta actividad metabólica similar a la del organismo parental (p.ej. procesos enzimáticos tales como: catalasa, coagulasa, ureasa, fermentación de carbohidratos)
No están relacionados genéticamente con las bacterias	Genéticamente son indistinguibles del organismo parental
El porcentaje de Guanina -Citosina - las bases del DNA es más bajo que el de cualquier bacteria	El porcentaje de Guanina-Citosina en las bases del DNA es similar al de la bacteria parental y es superior a la de los micoplasmas
Sensibles a la lisis por la <u>digitonina</u>	Resistentes a la lisis por la digitonina

Fallon, R.J. y Whittlestone, P. 1969 (47)

Las especies de micoplasmas requieren suero para su crecimiento - ya que necesitan de esteroides con una estructura molecular definida (planar) debido a la incapacidad de estas especies para sintetizarlos; también requieren de ácidos grasos saturados o insaturados que como los esteroides o carotenos (en el género Acholeplasma) forman parte de la membrana celular lipoproteica (108)

Los componentes del suero como las proteínas y fosfolípidos parecen ser necesarios para ayudar a la incorporación de los lípidos requeridos por estos microorganismos y también actúan detoxificando la superficie celular de lípidos activos.

Los micoplasmas requieren de nucleósidos o bases preformadas dependiendo de las especies para efectuar la biosíntesis de ácidos nucleicos. Algunas especies requieren pentosas ya sea en forma libre o a partir de nucleósidos para la síntesis o interconversión a otros nucleósidos. Las hexosas son requeridas en aquellas especies que obtienen su fuente de energía a partir de estos azúcares los cuales también sirven como precursores de los polisacáridos encontrados en muchas especies (120)

Existen requerimientos hacia el ácido nicotínico, riboflavina, ácido fólico, piridoxal, tiamina, inositol, colina, pantotenato y biotina los cuales son proporcionados en el medio de cultivo por extractos de levadura fresca o liofilizada (92)

Los micoplasmas crecen alrededor de un amplio rango de pH desde un pH de 6.8 a 9.2. Existen variaciones de especie, las cepas-T crecen alrededor de un pH ácido a 7. siendo el pH óptimo de 6.0 (102)

Los requerimientos gaseosos para el desarrollo de los micoplasmas dependen de la fisiología respiratoria de las especies, aquellas especies - con un citocromo terminal en la cadena respiratoria crecen mejor en condi -

ciones aeróbicas mientras las que presentan una flavina terminal lo hacen en condiciones anaeróbicas o microaerofílicas.

Los constituyentes del medio de cultivo tienen efectos sobre los requerimientos gaseosos. El CO_2 mejora o favorece el desarrollo de algunas especies en medios subóptimos. La glucosa no es utilizada por las especies fermentadoras en condiciones anaeróbicas por lo que necesitan otra fuente de carbono y energía, parece ser que algunas de estas especies fijan el dióxido de carbono (109)

9. Metabolismo

Por su actividad metabólica las especies de micoplasmas se han dividido en tres tipos fisiológicos (36)

- 1.- Fermentadoras de carbohidratos que no requieren esteroides
- 2.- Fermentadoras de carbohidratos que requieren esteroides
- 3.- No fermentadoras que requieren esteroides

Las especies fermentadoras producen ácido principalmente a partir de la glucosa, fructosa, manosa, almidón y glucógeno por el camino metabólico de Embden-Meyerhof siendo los productos terminales el lactato, acetato y CO_2 . Parece ser que el ciclo de los ácidos tricarbónicos no se encuentra en las especies fermentadoras. Las especies no fermentadoras de micoplasmas son capaces de reducir compuestos de tetrazolio cuando se incuban bajo condiciones anaeróbicas en presencia de ciertos compuestos como el lactato, fructosa y alcoholes monohídricos de cadena corta. Las cepas no fermentadoras son capaces de oxidar ácidos grasos de cadena corta como

el butirato, caprilato y valerato. Se ha demostrado la presencia de un camino oxidativo de ácidos grasos, así como la presencia de los ciclos de los ácidos tricarbóxicos y glióxicos. Es probable que estas especies no fermentadoras obtengan su energía a partir de la oxidación de ácidos grasos — (124). La capacidad reductiva de estas especies para el colorante tetrazolillo en presencia de ribosa y fructosa sugiere la presencia en estos organismos del camino metabólico de la hexosa-monofosfato ciertas especies exhiben actividad hacia algunos aminoácidos específicos como la arginina, glutamina, ácido glutámico y ácido aspártico (107)

La hidrólisis de la arginina conduce a la formación de citrulina - la cual sufre fosforilación para producir ornitina y carbamil-fosfato que en presencia de difosfato de adenosina es escendido a amoníaco, CO_2 y ATP La degradación de la arginina representa uno de los principales mecanismos para la producción de energía en las especies no fermentadoras (107)

10. IDENTIFICACION DE LAS ESPECIES DE MICOPLASMAS

La identificación de los micoplasmas se realiza de acuerdo con sus reacciones bioquímicas, básicamente, hacia la glucosa, arginina y urea (urea plasmias) y por su requerimiento o no hacia los esteroides (18). Sin embargo, estas reacciones solo permiten clasificarlos dentro de un cierto grupo y su identificación hasta especie se lleva a cabo utilizando pruebas serológicas. Entre estas pruebas las más ampliamente utilizadas son la Inhibición de Crecimiento (125), Inhibición metabólica (17) e Inmunofluorescencia Directa o Indirecta (115). Sin embargo, éstas pruebas pueden no ser del todo confiables y se ha recurrido en los últimos años a otro tipo de estudios para la identificación de especies relacionadas como: Técnicas de hibridación de

DNA (23), Análisis electroforéticos de isoenzimas (100) y Análisis electroforéticos de proteínas (7)

a. . INHIBICION DE CRECIMIENTO E INHIBICION METABOLICA

Nicol y Edward observaron que el crecimiento de los micoplasmas -- se inhibe con antisueros específicos (80). Esta observación condujo al desarrollo de un método serológico específico y sencillo para identificar a las especies de micoplasmas .

Los efectos inhibitorios del antisuero en esta prueba están mediados principalmente por las inmunoglobulinas de la clase Ig G y en un menor grado por las inmunoglobulinas de las clases IgM e Ig A y no es requerida la presencia del complemento (125)

Aunque esta es una reacción serológica altamente específica, la prueba de inhibición de crecimiento es poco sensible y los antisueros preparados para utilizarse en esta prueba deben presentar altos títulos. El tamaño de la zona de inhibición es proporcional al título de anticuerpos presentes en el antisuero; como resultado de la relativa insensibilidad del método (125)

Esta prueba se efectúa utilizando medio sólidos inoculados con las cepas a identificar y en los que se colocan discos impregnados con los antisueros, observándose inhibición de crecimiento alrededor del disco impregnado con el antisuero que identifica al organismo desconocido. Este efecto inhibitorio del antisuero también se observa en medio líquido pero debido a la dificultad de observar el crecimiento en éstos se requiere de un subcultivo en medio sólido para que se pueda demostrar la inhibición. Debido a ello se ha desarrollado una medida indirecta para valorar el crecimiento o

ausencia de este en presencia del antisuero. Esto se consigue agregando sus tratos apropiados que son utilizados por el microorganismo de prueba y agregando indicadores ya sea de oxido-reducción para aquellas especies que son capaces de reducir el colorante tetrazolio; o bien, un indicador de pH para aquellas especies fermentadoras de azúcares o capaces de hidrolizar la arginina. Esta es la base de la prueba de INHIBICION METABOLICA empleada tam bién para la identificación de especies de micoplasmas (17) (125)

b. EMPLEO DE LA INMUNOFLUORESCENCIA PARA LA IDENTIFICACION DE MICOPLASMAS

La inmunofluorescencia ya sea directa o indirecta es el método de elección para detectar o identificar especies de micoplasmas ya sea a partir de tejidos o de cultivos (97)(2)(38)

Debido a que a partir del primoaislamiento pueden encontrarse varias especies de micoplasmas, la identificación de estas especies bajo estas condiciones se dificulta y se requiere de una separación, ya sea empleando medios diferenciales, variaciones en el pH y temperatura de incubación o empleando los métodos de clonación de colonias individuales combinada con la filtración selectiva (49) (35). Por estos métodos los cultivos son sepa rados de una manera relativamente fácil, pero el proceso de separación es - laborioso; además, los cultivos mixtos pueden tener una morfología colonial similar, dificultando aún más la separación (19)

El procedimiento de la inmunofluorescencia permite la identificación rápida de las especies en los cultivos puros y mixtos sobre las colonias en placas de agar. Las colonias sobre los bloques de agar ya teñidas con el conjugado pueden observarse por medio de un microscopio con luz ultravioleta-

ta incidente utilizando un poder de resolución bajo. Unicamente las colonias homólogas al antisuero fluorecerán permitiendo su identificación tanto en cultivos puros como mixtos (2)

C. FACTORES INVOLUCRADOS EN LA PATOGENESIS DE LOS MICOPLASMAS

1. Mimetismo Biológico de los Micoplasmas

Se ha sugerido el concepto de mimetismo biológico para explicar - porque ciertos micoplasmas son inmunológicamente más reactivos en un huésped no natural más que en su huésped natural, debido a que ciertos micoplasmas tienen antígenos en común con el huésped natural y pueden provocar una respuesta inmune dirigida contra sus propios antígenos (25)

Como es el caso de Mycoplasma mycoides var mycoides causante de - la pleuroneumonía contagiosa bovina del que se ha aislado una galactana a partir de extractos con fenol caliente (67). Esta galactana no es inmunogénica y se dice que la presencia de esta prolonga la micoplasmaemia de M. mycoides var mycoides con localización de la infección a nivel de las articulaciones, debido al carácter hapténico de la galactana se cree que esta se une a anticuerpos circulantes formando complejos inmunes. Además, se cree que podría estar involucrada en una reacción alérgica como se sugiere por su reactividad cruzada con la galactana encontrada en los pulmones bovinos (103)

2. Hemolisinas

La actividad hemolítica de muchas especies de micoplasmas hacia -

los eritrocitos de muchas especies de animales es debida a la producción de péroxido de hidrógeno. Esta actividad hemolítica se inactiva por la catalasa y peroxidasa. La desnaturalización por calor de estas enzimas o su inhibición con el 3-amino-1,2,4-triazol destruyen la capacidad inactivante (26)

La actividad hemolítica es lábil al calor y se difunde a través de las membranas de diálisis. La hemólisis observada en algunas especies de M.gallisepticum, M.neurolyticum y M.pulmonis es el resultado de la formación de metahemoglobina debida a la excreción de péroxido por estos microorganismos (6)

3. Citopatogenicidad

Ciertos micoplasmas poseen la capacidad para adsorberse a eritrocitos (8) y células del epitelio traqueal (51), se postula que tal asociación permite dañar las membranas celulares de los tejidos por el péroxido sin que este pueda inactivarse por la catalasa o peroxidasa de los líquidos corporales (110)

La adsorción de los micoplasmas a eritrocitos o células epiteliales traqueales puede inhibirse por antisueros específicos. Los sitios de adsorción sobre las células son residuos de ácido siálico (111). La hemadsorción y hemaglutinación es inhibida por mucoproteínas que contienen ácido siálico, por el ácido siálico y por el tratamiento de los eritrocitos con neuraminidasa. Además, los sitios de adsorción sobre las células epiteliales traqueales pueden removerse o bloquearse por enzimas que destruyen el receptor o por tratamiento con virus de la influenza. El sitio sobre la membrana micoplasmal que se une a los residuos de ácido siálico no se ha establecido, existen sugerencias de que se trata de una lipoproteína o frac_

ción lípida (110)

4. Interferencia con el Metabolismo de las Células de los Tejidos

Las células de tejidos infectados con micoplasmas muestran un metabolismo alterado hacia los aminoácidos, debido a la competencia entre éstos, principalmente hacia la arginina. El cambio predominante es un rápido agotamiento de este aminoácido en el medio de cultivo, como resultado de este agotamiento hay un retraso en el crecimiento de las células y muerte temprana (101)

D. ENFERMEDADES DE LAS CABRAS PRODUCIDAS POR MICOPLASMAS Y QUE INVOLUCRAN AL PULMON

Existen por lo menos cuatro entidades clínicamente distintas que son causadas por micoplasmas en cabras:

- 1.- La pleuroneumonía contagiosa caprina (PCC)
- 2.- Agalactia contagiosa
- 3.- Peritonitis infecciosa
- 4.- Poliartritis caprina

Estos síndromes clínicos han mostrado ser de etiología micoplasmal múltiple, esto significa que se han aislado especies de micoplasmas diferentes a la especie clásica causante del síndrome (59). Por ejemplo: Mycoplasma agalactiae es el agente clásico de la agalactia contagiosa pero últimos reportes han implicado a Mycoplasma mycoides var mycoides y a Mycoplasma capricolum en síndromes similares a la agalactia contagiosa (88) (13) (14).

También parece que muchos casos de la pleuroneumonía contagiosa caprina son producidos por el grupo de Micoplasmas relacionados con la cepa F-38, pero tanto Mycoplasma mycoides var mycoides como Mycoplasma mycoides var capri pueden ser causa de la pleuroneumonía contagiosa caprina (68) (87) (29). Debido a que varias especies de micoplasmas se han aislado de enfermedades parecidas no existe una descripción clara de la patología y etiología de estas enfermedades, particularmente en el caso de la pleuroneumonía contagiosa caprina

La etiología específica de un brote ya sea de agalactia contagiosa o de PCC no puede ser inferido a partir de un diagnóstico clínico, sino que se requiere de la identificación del agente por métodos de cultivo y métodos serológicos.

1. DESCRIPCIÓN DE LA PLEURONEUMONIA CONTAGIOSA CAPRINA Y ESPECIES RELACIONADAS

La pleuroneumonía contagiosa caprina (PCC) ha sido reportada en Asia, Africa y sur de Europa donde se le considera como una de las principales enfermedades que afectan a la cabra (85). Esta afección ha sido reportada también en países como Estados Unidos, Canada, México y Australia (86) (58) (112) (66)

A pesar de estar ampliamente difundida no existe una descripción clara sobre la patología y etiología de esta enfermedad, debido a que varias especies de micoplasmas se han aislado de enfermedades parecidas a la PCC.

Cottew enlista dos agentes etiológicos definitivos de la PCC y un posible tercero (29):

- 1.- Mycoplasma mycoides var capri como el agente clásico de la PCC
- 2.- Mycoplasma mycoides var mycoides como un agente causal adicional
- 3.- Un organismo no tipificado representado por la cepa F-38

En un estudio de revisión sobre el tema Mc Martin y col. (78) consideran la descripción hecha por Hutcheon en 1881 sobre la pleuroneumonía contagiosa caprina como una referencia para compararla con las descripciones hechas por otros autores sobre la enfermedad y diferenciarla de otras neumonías caprinas similares a la PCC.

Mc Martin considera tres puntos principales en el trabajo de Hutcheon y a los que el hace referencia para hacer comparaciones con los hallazgos de otros investigadores de la PCC, estos puntos son:

- 1.- La enfermedad es altamente contagiosa para cabras susceptibles

2.- Los borregos y bovinos no se infectan

3.- La reacción que se desarrolla cuando se administra un inóculo infectivo subcutáneamente en cabras no es edematosa

Mc Martin compara la descripción de Hutcheon con la descripción hecha por Schellhase en 1912 quién en el oeste de Africa describió una enfermedad de las cabras a la que él denominó pleuroneumonía Infecciosa. -- Schellhase reprodujo la enfermedad inoculando un fluido infeccioso obtenido del pulmón de una cabra enferma. La inoculación subcutánea de este inóculo causó una reacción generalizada y local que la separa de la descrita por Hutcheon.

Los primeros estudios de transmisión realizados con un micoplasma caprino que causaba PCC fueron realizados por Beaton en Nigeria quien observó que en condiciones naturales la enfermedad se disemina rápidamente por contacto a cabras susceptibles y que experimentalmente esto no ocurre (15). Además, considera que la patología de los casos naturales era diferente de la que se produce experimentalmente por lo que él concluye que su aislamiento no era la causa de la PCC.

Shirlaw en 1949 y Longley en 1951 aislaron micoplasmas que producen la misma clase de enfermedad descrita por Beaton (104)(68)

Chu & Beveridge en 1949 aislaron una cepa de micoplasma considerada hasta ahora como una cepa de referencia, la PG-3. Esta cepa fue aislada en Inglaterra a partir del exudado pleural del pulmón de una cabra enferma que fue enviado desde Turquía. Esta cepa mostró ser patógena para cabras infectadas intranasalmente por aerosol, las cuales desarrollaron una pleuroneumonía (cito en 76)

Otras cepas aisladas de PCC como la Farcha, GPA y Smith mostraron comportamientos similares sobre casos experimentales.

Posteriormente Cottew (33) y Goni & Onoviran (52) mostraron que la enfermedad experimental causada por este grupo de aislamientos era similar a la descrita por Beaton(15), Shirlaw (104) y Longley (68).

Al-Aubaidi y col (1) mostraron por medio de la prueba de Inhibición de crecimiento que la cepa Vom aislada por Longley en Nigeria era diferente de la PG-3

Numerosas cepas se asociaron con la PCC la PG-3, GPA, Farcha y la cepa Smith que mostraron ser cepas de M. mycooides var capri. La cepa Vom, cepas americanas y algunas cepas turcas mostraron ser M. mycooides var mycooides de origen caprino (11) (33)

La cepa F-30 aislada a partir de casos crónicos de PCC en Kenia fue capaz de producir la enfermedad experimentalmente en cabras y borregos por la ruta intratraqueal/endobronquial además, causó una reacción subcutánea edematosa en el cuello y micoplasmaemia. Todas las cabras inoculadas murieron y sólo algunos borregos(69). La enfermedad no se transmitió por contacto, aunque los animales en contacto desarrollaron anticuerpos fijadores de complemento al microorganismo.

También en Kenia se realizó el aislamiento de la cepa F-38 a partir de casos agudos de PCC. La enfermedad desarrollada por este organismo en condiciones experimentales fue contagiosa no únicamente de animales inoculados a animales en contacto sino también de estos últimos a otros animales susceptibles (72)

Según Kaliner & Mac Owan la patogénesis de la cepa F-38 es diferente a la observada con cepas de M. mycooides var mycooides y M. mycooides var capri. Las cepas de estos últimos grupos producen una reacción edematosa cuando se administran subcutáneamente y una reacción similar cuando se administran intramuscularmente produciendo esplenomegalia, edema y en-

engrosamiento del septo interlobular en el pulmón. A diferencia de lo anterior la cepa F-38 produce lesiones pulmonares caracterizadas por un edema intralobular intersticial. Este organismo fue patógeno cuando se administró por otras rutas (70). Los borregos inoculados con esta cepa no desarrollaron una enfermedad clínica o una respuesta de anticuerpos fijadores de complemento aún después de un contacto prolongado con cabras afectadas de la enfermedad producida por la F-38

Mc Martin considera que las características de la PCC y las de la enfermedad producida por la F-38 son idénticas (altamente contagiosas, patogenicidad, patología, especies de animales afectados y la ausencia de una reacción a la inoculación parenteral del organismo vivo) por lo que sugiere debe tratarse de la misma enfermedad descrita por Hutcheon, pero que es necesario investigar más para establecer si el organismo tipo F-38 es la causa de la PCC en otras ciudades diferentes de Kenia

Los casos de PCC por la cepa G-29, incluida en el grupo de la F-38, en condiciones naturales y experimentales fueron similares a los de la F-38 (62)

Un comportamiento similar se observó con la cepa Vom en las mismas condiciones experimentales estudiadas y con la cepa F-30 actualmente reconocida como M. mycoides var mycoides (62)

Se habla de la posibilidad de que el grupo F-38 difiera de otras especies de micoplasmas aislados de casos de PCC. Sin embargo, Mc Martin considera que no existe un significado real de las especies de micoplasmas aisladas de casos de PCC antes del grupo F-38 y que es necesario una mayor investigación que revele los tipos específicos de neumonía con los que se encuentran involucrados especialmente la PG-3 y los serotipos de M. mycoides var mycoides; pues según él, estas especies no llenan los criterios --

descritos por Hutcheon para la PCC y no se les puede considerar como agentes etiológicos primarios además de que estas especies se han aislado de diversos síndromes y ciudades donde la PCC no ha sido reportada (78)

Sin embargo estas especies han mostrado ser patógenas para cabras infectadas experimentalmente por la ruta endobronquial y ser capaces de desarrollar lesiones características de pleuroneumonía, observándose consolidación edematosa, el septo interlobular engrosado y depósitos de fibrina - sobre la pleura junto con exudado pleural (84). Estas lesiones fueron descritas con anterioridad por Longley en 1951

Trabajos anteriores para reproducir la enfermedad experimentalmente con aislamientos de PCC fueron poco afortunados, quizás debido a las rutas de inoculación empleadas. Laws en 1956 empleando la ruta intraperitoneal fue incapaz de producir PCC pero los animales desarrollaron una peritonitis fibrinosa fatal (63). Cottew produjo PCC experimentalmente en cabras con cepas de M. mycoides var capri pero fracasó al intentar reproducir la enfermedad con M. mycoides var mycoides (33)

Lo que sí está establecido es que M. mycoides var mycoides causa - un síndrome de artritis-mastitis-queratoconjuntivitis y se ha aislado de - pulmones neumónicos de cabras que no presentaban lesiones características de PCC (95) (119)

Aunque Mc Martin considera el grupo F-38 como la causa de la PCC en Kenia y como posible causa de esta afección en otras ciudades pone en duda la etiología y patología de las especies de M. mycoides (78)

Sin embargo Cottew en 1979 consideró dos agentes etiológicos definitivos de la PCC y posiblemente un tercero. La consideración hecha por Cottew quizás sea la más acertada pues estas especies han mostrado producir PCC, por la ruta intratraqueal / endobronquial (29)

2. Mycoplasma mycoides var mycoides

M. mycoides var mycoides aislada de cabras causa en estos animales . septicemia aguda, poliartritis, conjuntivitis, queratinitis y abscesación-cervical (99) (58). La enfermedad afecta principalmente cabras jóvenes de menos de un año de edad caracterizada, en estos, por septicemia y poliartritis. En animales adultos mastitis, conjuntivitis, neumonía, y artritis (99). Los signos de esta micoplasmosis caprina son más o menos severos y están asociados como regla general con un síndrome de mastitis-artritis (95).

Los signos clínicos que se presentan en animales afectados son: de presión, anorexia, piroxia, cojera, hinchazón de las articulaciones y descarga nasal purulenta

A la necropsia las articulaciones afectadas contienen líquido amarillento que puede ser claro o turbio con acúmulos de fibrina. En casos crónicos la cápsula de la articulación y tejido periarticular se muestra engrosado.

La glándula mamaria afectada presenta congestión y contiene líquido amarillento con fibrina, los nódulos linfáticos de la glándula mamaria están aumentados y edematosos (95)

a. Características Bioquímicas de M. mycoides var mycoides

Se han aislado variantes caprinos de M. mycoides var mycoides que son serológicamente indistinguibles por las pruebas de inhibición de crecimiento e inhibición metabólica de las cepas de M. mycoides var mycoides -- aisladas de bovinos (1) (83) (79)

Sin embargo estas dos variantes se pueden diferenciar por el tama-

ño de colonia que producen en dos tipos: grandes y pequeñas (31). Las cepas de M. mycooides var mycooides aisladas de cabras producen colonias grandes mientras que las cepas aisladas de bovinos de esta especie producen colonias pequeñas (57) (123)

Las características que diferencian a M. mycooides var mycooides tipo colonias pequeñas son: su capacidad para digerir la caseína, licuar el suero coagulado, sobrevivencia por más tiempo a 45°C, formación de colonias grandes sobre medios sólidos y producción de una mayor turbidez en medios líquidos (56) (106) (Cuadro 3)

La patogenicidad de los dos tipos es diferente para bovinos como para cabras. Hasta el momento los tipos de colonias grandes aisladas de cabras no son patógenas para el bovino en condiciones naturales (29)

Aislamientos de esta especie, a partir de cabras, fueron reportados en un principio como M. mycooides var capri (86) (58). Actualmente han sido reclasificados como M. mycooides var mycooides (1). Lo anterior llegó a crear gran confusión entre la pleuroneumonía contagiosa caprina y otras enfermedades ocasionadas por micoplasmas que involucran al pulmón, como es el caso de la especie ahora referida; así como con las afecciones producidas por M. capricolum y cepas no tipificadas (27) (70)

Debido a que M. mycooides var mycooides ha sido aislado de enfermedades parecidas a la agalactia contagiosa el diagnóstico diferencial es clínicamente imposible y deben de realizarse métodos de cultivo y métodos serológicos para determinar la etiología de la enfermedad ya que afecciones similares pueden ser producidas por M. capricolum o por M. agalactiae (87)

3. Micoplasmas Relacionados con el Grupo F-38

Mac Owan y Minette en 1976 realizaron el aislamiento de una cepa de micoplasma causante de PCC aguda en Kenia, la cepa F-38 que probó ser - patógena no solo para cabras inoculadas experimentalmente sino también pa - ra animales susceptibles en contacto con los inoculados (70) (72). Desde, entonces se han hecho frecuentes aislamientos del mismo serotipo de casos agudos en ese país donde también se ha reportado la presencia de PCC cró - nica producida por la cepa F-30 relacionada con M. mycoides var mycoides - (69)

La patogénesis de la cepa F-38 es diferente de la causada por las cepas de M. mycoides var mycoides y M. mycoides var capri. Las lesiones - se caracterizan por un edema intralobular intersticial que se encuentran confinadas a uno o a los dos pulmones (84)

a. Características del Grupo F-38

El status taxónomico de la cepa F-38 no se ha aclarado. En un prin - cipio se dijo que no pertenecía a ninguna de las especies con las cuales - fue comparada en los centros de referencia de micoplasmas de Inglaterra y Dinamarca (76). Sin embargo, las pruebas de Fijación de Complemento y Difu - sión en gel indicaron que esta cepa estaba relacionada con M. mycoides - (70)

Por otro lado los estudios de Análisis Electroforéticos y Análi - sis de isoenzimas realizados con el grupo F-38 y con las especies de M. my - coides var mycoides, M. mycoides var capri y M. capricolum mostraron una - estrecha relación entre M. capricolum y el grupo F-38. Una relación simi - lar entre las diferentes subespecies de M. mycoides también fue observada mientras que estas subespecies mostraron estar alejadas de M. capricolum y el grupo F-38 (7). Sin embargo, se sigue considerando al grupo F-38 co -

mo una especie diferente y se ha pensado designarlo como una especie diferente y se ha pensado designarlo como M. capripneumoniae (78)

4. Mycoplasma capricolum

Ha sido reportado en Australia, Francia, España, India, Reino Unido y E.U.A. donde se le ha encontrado asociado principalmente con poliartrosis pero también es causa de mastitis, vulvovaginitis y neumonía (9) -- (61) (118)

este agente fue aislado por Cordy en 1955 y mostró ser un micoplasma altamente patógeno para cabras a las que les causaba artritis y pleuro-neumonía (27) Cordy consideró a este microorganismo similar en muchos aspectos al micoplasma aislado en la afección descrita por Longley (68) y al caracterizado por Edward (43); excepto que esta especie aislada fermentaba dos azúcares más, la galactosa y el manitol.

M. capricolum es capaz de producir un síndrome similar a la agalactia contagiosa parecido al que produce M. agalactiae (88) (14)

Se ha aislado de borregos donde se le asoció con un brote de vulvovaginitis y balanopostitis. En estos animales la infección fue inaparente por un año, tiempo en el que no se desarrollaron signos de enfermedad como: poliartrosis, mastitis o neumonía sugiriendo que M. capricolum se encuentra limitado únicamente al aparato urogenital (61)

Las lesiones patológicas observadas en el pulmón neumónico incluyen una granularidad sobre la superficie externa del área afectada

Microscópicamente la reacción es una bronconeumonía de tipo agudo-purulento con agregados linfoides alrededor de los bronquiolos y pequeños vasos sanguíneos. El septo interlobular se muestra engrosado por prolife-

ración fibroblástica e infiltración linfocitaria (9)

a. Características Bioquímicas de Mycoplasma capricolum

Es capaz de fermentar la glucosa e hidrolizar la arginina presenta actividad de fosfatasa, digiere el suero coagulado, no forma película y manchas y reduce el tetrazolio en condiciones aeróbicas y anaeróbicas (46) (Cuadro 3)

5. Mycoplasma agalactiae

Es el agente clásico de la agalactia contagiosa de ovinos y caprinos. Fue aislado por primera vez por Bridré & Donatien (20). Representa uno de los micoplasmas más patógenos para estas especies (28).

Es principalmente causa de mastitis pero produce también artritis, queratoconjuntivitis, pleuresía y vulvovaginitis (29) (105)

Se reporta principalmente de ciudades del Mediterraneo pero se ha aislado de la India y Norteamérica (9) (37)

Informes recientes de Francia, España e Israel indican que este síndrome clínico puede producirse por otras especies de micoplasmas diferentes a M. agalactiae y que han mostrado ser M. mycoides var mycoides tipo colonias grandes y M. capricolum (88) (14)

Los problemas respiratorios producidos con este micoplasma se observan más frecuentemente en animales jóvenes y se le ha encontrado asociado con bacterias como; Pasteurella s.p., Bordetella bronchiseptica y Streptococcus s.p. (87)

Las lesiones patológicas observadas en el pulmón afectado por M. agalactiae, son áreas de consolidación gris-rojiza en el lóbulo apical izquierdo

do. Microscópicamente se observa una neumonía intersticial y el septo interalveolar engrosado debido a una hiperplasia de células mesenquimatosas y fibroblastos (9)

a. Características Bioquímicas de Mycoplasma agalactiae

No fermenta carbohidratos ni cataboliza la arginina, forma pellicula y manchas y reduce el tetrazolio tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas (46) (Cuadro 3)

6. Mycoplasma ovipneumoniae

Se ha aislado principalmente del aparato respiratorio de borregos con neumonía proliferativa intersticial. En los últimos años se ha mostrado su presencia también en los problemas respiratorios de la cabra (24) (55)

Se caracteriza por ser una enfermedad que toma un curso crónico en la mayoría de los casos (114), asociándose a este virus (Parainfluenza-3, adenovirus) y bacterias (Pasteurella, E. coli, Klebsiella, Corynebacterium s.p., etc.) (21) y también M. arginini (3)

Se ha aislado de exudados nasales de animales con y sin neumonía crónica y es recuperado con mayor frecuencia de animales aparentemente sanos que M. arginini; y ambos se aíslan más de pulmones neumónicos que de normales (75) (4)

Las lesiones patológicas que se observan en el pulmón afectado por M. ovipneumoniae son áreas de consolidación gris-

rojiza en los lóbulos apicales y cardíaco; pueden también observarse áreas de atelectasia. Los nódulos linfáticos peribronquiales se encuentran aumentados de volumen. Microscópicamente se observa una marcada neumonía interlobular intersticial con engrosamiento del septo alveolar debida a la proliferación de células epiteliales alveolares e histiocitos, el lumen alveolar se llena de células epiteliales alveolares de descamación. Se observa hiperplasia de los folículos linfoides peribronquiales. Además de estos cambios proliferativos, se puede llegar a observar una infiltración de neutrófilos intraluminal (116) -- (117)

a. Características Bioquímicas de Mycoplasma ovipneumoniae

Fermenta la glucosa, no cataboliza la arginina, no forma película y manchas, no digiere el suero coagulado, no presenta actividad de fosfatasa, reduce el tetrazolio en condiciones anaeróbicas, pero su reacción en condiciones aeróbicas es dudosa. Una característica peculiar es que sus colonias no presentan centro (114) (46) (Cuadro 3)

7. Mycoplasma arginini

Se ha recuperado de una amplia variedad de condiciones patológicas, así como de varias especies de animales (bovinos, borregos, cabras, gatos, ratones) y sin embargo, su papel real se desconoce (64)(60)

En cabras y borregos se ha aislado de pulmones neumónicos (24)-- (116) pero hasta ahora no se le considera como agente primario de neumonía

Experimentalmente se produjo neumonía en corderos libres de patógenos específicos inoculados intratraquealmente con M. arginini (48)

Se ha recuperado frecuentemente con M. ovipneumoniae en casos de neumonía progresiva intersticial lo que sugiere una posible asociación entre estos dos micoplasmas (3)(114)

En la India y en México se ha aislado de pulmones neumónicos de cabras en un porcentaje considerable (9) (24)

Las lesiones neumónicas asociadas a M. arginini se encuentran localizadas en los lóbulos apicales de ambos pulmones en los que se puede observar una consolidación gris-rojiza, en algunos casos se observa el septo interlobular marcadamente engrosado con exudado serofibrinoso. Microscópicamente se observa una neumonía intersticial y presencia de grandes células mononucleadas y multinucleadas e infiltración linfocitaria peribronquial y perivascular. Se ha reportado también una bronconeumonía purulenta -- (9)

a. Características Bioquímicas de Mycoplasma arginini

No fermenta la glucosa pero si cataboliza la arginina, no reduce el tetrazolio ni en condiciones aeróbicas ni en condiciones anaeróbicas, - no forma película y manchas, no tiene actividad de fosfatasa y no digiere el suero coagulado (46) (Cuadro 3)

REACCIONES BIOQUÍMICAS DE MYCOPLASMAS DE
ORIGEN OVINO Y CAPRINO

Especies o serogrupos	Cepa de ref.	fermentación de glucosa	hidrolisis de la arg.	actividad fosfatasa	digestión de suero	pel. y manchas	red de tetra zolio ae/ana*
<i>M. mycoides</i> var <u>CAPRI</u>	PG-3	+	0	0	+	0	+/+
<i>M. mycoides</i> var <u>MYCOIDES</u>	Y-goat	+	0	0	+	0	+/+
<i>M. conjunctivae</i>	HRC581	+	0	0	0	+	0/+
<i>M. ovipneumoniae</i>	Y-98	+	0	0	0	0	(+)/+
<i>M. putrefaciens</i>	KS 1	+	0	+	0	+	(+)/+
<i>M. capricolum</i>	Cal. kid	+	+	+	+	0	+/+
<i>M. arginini</i>	G-230	0	+	0	0	0	0/+
<i>M. caprino</i> grupo 5	goat-145	0	+	+	0	0	0/0
<i>M. agalactiae</i>	PG-2	0	0	+	0	+	+/+
<i>M. caprino</i> grupo 7	A 1343	0	0	+	0	0	+/+
<i>M. caprino</i> grupo 11	2-D	0	0	+	0	+	0/+
<i>Acholeplasma oculi</i>	19-L	+	0	0	0	0	+/+

ae/ana* = aeróbio/anaeróbio

Ermó y col. 1978 (46)

II. O B J E T I V O

Aislar e Identificar las especies de micoplasmas involucradas en las neumonías de las cabras a partir de muestras de pulmones neumónicos y correlacionar el análisis histopatológico y las especies bacterianas aisladas con los aislamientos de micoplasmas. Para así, comprender mejor la interacción de los diferentes agentes que participan en la etiología y patogenia del proceso neumónico caprino

III. MATERIAL Y METODOS.

A. Obtención de Muestras.

Se colectaron muestras de pulmones neumónicos y de pulmones aparentemente sanos de los rastros de Capulhuac, Edo. de México y Milpa Alta D.F., las muestras de pulmones neumónicos presentaban varios grados de lesión neumónica. Estas muestras fueron divididas en tres partes que fueron destinadas para el estudio bacteriológico de rutina, análisis histopatológico y para el aislamiento de micoplasmas. Tanto las muestras de pulmones neumónicos como las muestras de pulmones aparentemente sanos recibieron el mismo tratamiento.

B. Estudio Bacteriológico.

1. Medios de Cultivo.

Para el análisis bacteriológico de las muestras se prepararon placas de agar sangre a partir de un medio base de agar sangre que fue esterilizado a 15 lb, 12 C durante 15 min y adiconado con sangre de bovino desfibrinada estéril a una concentración final de 10%; además, se prepararon placas de agar Mac Conkey para enterobacterias. Estos fueron los medios utilizados para el primoaislamiento y desarrollo de las bacterias aisladas.

Los medios de pruebas bioquímicas utilizados en la identificación de bacterias fueron: medio de Hugh-Leifson (OF), TSI (Triple azúcar hierro) SIM (ác. sulfhídrico, índol, motilidad), Urea, Citrato, MR - (rojo de metilo), VP (reacción de Voges-Proskauer), Gelatina, Nitratos (prueba de reducción de nitrato), y medio de agua peptonada para probar la capacidad fermentativa de los aislamientos a diferentes azúcares.

2. Tratamiento de las Muestras Para el Estudio Bacteriológico.

Las muestras fueron sembradas por contacto en placas de agar - sangre y Mac Conkey. Para evitar el desarrollo de contaminantes, la superficie de las muestras fue quemada con espátulas calientes antes de la siembra. Las placas inoculadas se incubaron en condiciones aeróbicas durante 24 a 48 hrs a 37°C. Después de este tiempo de incubación se hizo una separación de los diferentes tipos de colonias en agar sangre y en Mac Conkey, nuevamente se incubó de 24 a 48 hrs bajo las mismas condiciones. A los aislamientos se les efectuaron la tinción de Gram, prueba de catalasa y oxidasa y pruebas bioquímicas como: OF, TSI, SIM, MR-VP, gelatina, urea, nitratos, citratos y fermentación de azúcares en agua peptonada. La identificación de las bacterias se hizo de acuerdo a los procedimientos descritos por Cowan & Steel (34).

C. ESTUDIOS HISTOPATOLOGICO

Las muestras para el estudio histopatológico se fijaron en solución amortiguada de formalina al 10%. La muestra ya fijada se incluyó en parafina y se efectuaron cortes histológicos, los cuales fueron teñidos con hetoxilina y eosina.

D. AISLAMIENTO DE MICOPLASMAS.

1. Medios de Cultivo para Micoplasmas.

Para el cultivo y aislamiento de micoplasmas se emplearon los medios de Eaton y Friis (42) (50) líquidos y sólidos que se prepararon a

partir de medios basales comerciales y a los que se les adicionó suero de caballo, extracto de levadura e inhibidores.

Medio de Eaton modificado por Roberts & Pi Joan (96)

PPLO Caldo sin cristal violeta (lab. Difco)	21 g
Glucosa	1 g
DNA (lab. Kodak)	0.02 g
Sol. de rojo de fenol al 1%	2 ml
agua destilada	700 ml

Este medio se esterilizó en autoclave a 15 lb, 121 C/15 min., después de esterilizarlo y a una temperatura no mayor de 50°C se le agregaron en condiciones asépticas:

Suero de caballo estéril	200 ml
Extracto de levadura fresca	100 ml
Penicilina G. sódica	500 000 UI

Preparación del extracto de levadura (22) (17).

Se suspendieron 50 g de levadura fresca para panadería en 100 ml de solución al 0.2M de KH_2PO_4 , la suspensión se calentó a 85°C durante 20' y se dejó reposar en refrigeración toda la noche, posteriormente se centrifugó a 2000 G por 10 min. para clarificar y se esterilizó por filtración distribuyéndose en viales de 50 ml los cuales se almacenaron a -20°C.

Medio HP "Hyopneumoniae" modificado por Friis (50)

PPLO caldo sin cristal violeta (lab Difco)	2.5 g
BHI caldo (lab. Bioxon)	2.5 g
Sol. de rojo de fenol al 0.2%	3.5 ml
DNA (lab Kodak)	0.01 g
Clorhidrato de cisteína	0.01 g
Solución salina balanceada de Hanks	152 ml
Agua destilada	225 ml

Se esterilizó en autoclave a 15 lb, 121 C/15 min., posteriormente se agregó en condiciones asépticas:

Suero de caballo estéril	200 ml
Extracto de levadura fresca	20 ml
Penicilina G. Sódica	500 000 UI

Estos medios se distribuyeron en tubos de 13 x 100 mm con tapón de rosca a razón de 3 ml con ayuda de una jeringa automática estéril y en condiciones asépticas.

Los medios sólidos se hicieron agregando agar al 0.9% a los medios basales y distribuyéndose en placas de Petri.

Solución salina balanceada modificada de Hanks

Solución Stock "A"

NaCl	80.0 g
KCl	4.0 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	1.0 g
MgCl ₂ 6 H ₂ O	1.0 g
Ca Cl ₂	1.4 g
H ₂ O destilada	500 ml

Solución Stock "B"

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$	1.5 g
KH_2PO_4	0.6 g
H_2O destilada	500 ml

Para su uso, 25 ml de la solución "A", se mezcló con 400 ml de agua destilada, después se agregaron 25 ml de la solución stock "B" y se aforó hasta 500 ml.

2. Medios Para Caracterización Bioquímica de los Micoplasmas.

Los medios empleados para determinar la hidrólisis de la arginina y la fermentación de azúcares por los micoplasmas se prepararon sobre los medios basales de Eaton y Friis.

a. Medio para la Hidrólisis de la Arginina'

PPL0 caldo s/cristal violeta	10.5 g
Rojo de fenol sol. ac. al 0.2%	6.25 ml
Agua destilada	250 ml

Se esterilizó en autoclave a 15 lb, 121 C/15 min., posteriormente se agregó en condiciones asépticas:

Suero de caballo	100 ml
Extracto de levadura	50 ml
L (-) Arg-HCl sol. al 50%	10 ml
Penicilina G. sódica	250000 UI

Se ajustó el pH del medio a 7.0 con NaOH 1N estéril

b. Medio para la fermentación de azúcares

PLO caldo s/cristal violeta	0.25 g
BHI caldo	0.25 g
R rojo de fenol sol. ac. al 0.2%	0.35 ml
Agua destilada	45 ml
Sol. balanceada de Hanks	30 ml
DNA	0.001 g

Se esterilizó en autoclave a 15 lb, 121 C/15 min., y se agregaron en condiciones asépticas:

Suero de caballo	10 ml
Extracto de levadura	5 ml
Solución del azúcar de prueba al 10%	10 ml
Penicilina G sódica	50 000 UI

Los medios se distribuyeron en tubos con tapón de rosca de 13 x 100 mm a razón de 3 ml con ayuda de una jeringa automática y en condiciones asépticas.

3. Tinción de Dienes para identificación de colonias de micoplasma.

Tinción de Dienes (17)

Azul de metileno	2.5 g
Azur II	1.25 g
Maltosa	10 g
Carbonato de Sodio	0.25 g
Ac. Benzoico	0.2 g
Agua destilada	100 ml

Se cortaron pequeños bloques de agar con colonias sospechosas de micoplasmas, éstos bloques se colocaron sobre un portaobjetos y fueron cubiertos completamente con el colorante.

Otra forma de probar si estas colonias en forma de huevo frito eran realmente colonias de micoplasmas fue subcultivando en medio líquido libre de antibiótico y de suero (si se trata de colonias de formas "L", estas revierten a la forma bacteriana normal).

D.4. Procedimiento para el aislamiento y cultivo de micoplasmas

Se tomaron pequeños pedazos del afeá afectada de pulmón buscando que los bronquiolos pequeños fueran abiertos a lo largo, además el tejido pulmonar se "trituro" con la ayuda de pinzas y tijeras flameadas con alcohol. Estos pedazos se introdujeron en un tubo conteniendo medio para el cultivo de micoplasma y se agitó fuertemente. Se efectuaron diluciones logarítmicas hasta la dilución 10^{-4} de la muestra original. Se incubó a 37°C por una semana, examinándose diariamente.

Se realizaron subcultivos en medio líquido y sólido los cuales se incubaron a 37°C por 3 a 4 días en condiciones microaerófilas y en cámara húmeda después de este tiempo de incubación las placas fueron examinadas con la ayuda de un microscopio estereoscópico para la búsqueda de colonias de micoplasmas. Si en ese momento no se observó desarrollo de colonias de micoplasma las placas fueron incubadas por más tiempo para dar oportunidad de que hubiera desarrollo de micoplasmas difíciles de cultivar o de adaptarse.

- a. Purificación de los aislamientos de micoplasmas por clonación.

La clonación se realizó de una forma sencilla utilizando tubos capilares con los que se tomaron colonias individuales de micoplasmas, que fueron subcultivadas en medio líquido y posteriormente cultivadas de nuevo en medio sólido. Este procedimiento de clonación se efectúa tres veces. Se observaron detenidamente las posibles diferencias morfológicas entre las colonias.

b. Prueba de dependencia de esteroides.

Prueba de la Digitonina.

Los aislamientos de micoplasmas purificados, fueron inoculados en placas de medio de Friis y sobre la superficie del agar se colocaron discos de papel filtro absorbente estériles impregnados con una solución de digitonina al 1.5% previamente esterilizada por filtración. Las placas se incubaron a 37°C por 3 días y fueron examinadas al cabo de este tiempo con ayuda del microscopio estereoscópico. En el género Mycoplasma se observa inhibición de crecimiento alrededor de los discos indicando dependencia de esteroides para este género. El género Acholeplasma no es inhibido ya que no requiere de esteroides para su desarrollo. La digitonina reacciona con los esteroides que tienen un grupo hidroxilo en el carbono 3 de la configuración B. El complejo que se forma es insoluble.

c. Pruebas de Fermentación de Carbohidratos.

La capacidad de los aislamientos de micoplasma para fermentar los azúcares se realizó en medio basal de Friis adicionado con el azúcar de prueba a una concentración del 1%. El análisis de este tipo de prueba se realizó para determinar el patrón de fermentación de los aislamientos hacia los azúcares con el fin de ayudar u orientar en la identificación de las especies de Mycoplasmas.

Se inocularon tubos conteniendo el azúcar de prueba, con 0.1 ml de cultivo reciente de los aislamientos. Se utilizaron tubos de medio líquido sin inocular como controles. Los tubos inoculados y no inoculados fueron incubados a 37°C se observaron y se registraron los cambios de color diariamente por 7 días. Un resultado de fermentación positivo se indicó por el cambio de color del indicador del medio, de rojo a amarillo, debido a la producción de metabólitos ácidos a partir de los azúcares. Los tubos en los que no se observó ningún cambio de color se registraron como negativos. Se registraron como reacciones débiles (±) los cambios de color rojo al naranja.

d. Pruebas de hidrólisis de aminoácidos.

Los aminoácidos utilizados para la caracterización de los aislamientos fueron el clorhidrato de la arginina, clorhidrato de la lisina; y sus derivados como el clorhidrato de la ornitina al 1% en medio basal de Friis. La descarboxilación metabólica de los aminoácidos por algunas especies de micoplasmas se apreció por un cambio alcalino en el medio.

Los tubos de medio con el aminoácido de prueba fueron inoculados con 0.1 ml de un cultivo de cada uno de los aislamientos a probar estos - tubos se incubaron a 37°C junto con tubos control (medio no inoculado) - bajo condiciones aeróbicas por 6 días examinándose diariamente. La prueba se dio como positiva cuando el indicador en el medio cambió de color de rojo a violeta. Un resultado negativo se registró cuando no hubo cambio en la coloración del medio.

e. Formación de Película y Manchas.

Se sembraron placas de medio de Friis con 20% de suero de caballo con cada uno de los aislamientos de prueba en crecimiento acti-

vo. Las placas se incubaron a 37°C en una cámara húmeda por tres días. Después de este tiempo se examinaron a simple vista o con el microscopio estereoscópico observándose en las especies productoras de película depósitos cristalinos confluentes además de las colonias sobre la superficie de agar. Este fenómeno denominado formación de película y manchas es ampliamente usado en la clasificación de micoplasmas. Estos depósitos son precipitados de jabones de calcio y magnesio, contienen además colesterol y fosfolípidos que se forman por la actividad de lipasas o fosfolipasas.

f. Producción de Peróxido de Hidrógeno.

Se cortaron pequeños cuadros de agar con colonias de micoplasmas que fueron colocados sobre portaobjetos. La superficie del bloque de agar se lava con PBS pH 7.0 0.01 M para quitar cualquier depósito sobre las colonias. Se agregan sobre éstas algunas gotas de una suspensión de eritrocitos humanos tipo O al 0.25% en solución de azul de metileno al 0.01% en buffer de fosfatos salino 0.01 M pH 7.0 se dejó por 15 minutos en una cámara húmeda a temperatura ambiente. Después de este tiempo los bloques de agar se observaron al microscopio estereoscópico (10x).

Los eritrocitos depositados alrededor de las colonias en las especies productoras de peróxido de hidrógeno fueron teñidos de azul; esto se cree, es debido a una alteración en la permeabilidad de la membrana del eritrocito a consecuencia de la formación de metahemoglobina por el peróxido de hidrógeno. Normalmente el eritrocito acumula azul de metilo al que puede retener intracelularmente en una forma reducida..

5. Preparación de Antígenos y Antisueros.

a. Preparación del Antígeno Inmunizante.

Con el fin de producir antisueros de las cepas de referencia de M. capricolum (Goat-189), M. mycoides var capri (PG-3), M. ovipneumoniae (Y-98), M. caprino del grupo 5 (Goat-145) M. caprino del grupo 7 (A-1343), estas fueron primeramente adaptadas al medio de Friis el cual fue usado para la producción del antígeno inmunizante (células completas).

Se inocularon tubos con 3 ml de medio de Friis con 0.1 ml de un cultivo de las cepas de referencia respectivamente. El volumen del cultivo se incrementó a través de pases que se hicieron a intervalos de 48 hrs de incubación hasta alcanzar un volumen final de 2000 ml. Se revisó que estos cultivos no estuvieran contaminados, inoculando placas de agar sangre con pequeños volúmenes del cultivo durante cada pase.

La cosecha de las células se hizo por centrifugación a 15000 gravedades por 30 minutos, en una centrífuga refrigerada para altas velocidades.

El líquido sobrenadante fue eliminado y el paquete celular se resuspendió en PBS pH 7.2 0.01 M estéril efectuando 3 lavados a la misma velocidad y tiempo. El paquete celular se resuspendió en PBS pH 7.2 0.01 M a un volumen final de 100 veces su volumen original y fue distribuido en viales a razón de 2 ml y congelados a -70°C.

a.1. Preparación del Inóculo.

El paquete celular listo para inocular fue homogeneizado con

un volumen igual de adyuvante completo o incompleto de Freund según correspondiera con el programa de inoculación en un vortex (vortex-genie) a una intensidad de 5 por 5 minutos. Esta mezcla se inoculó inmediatamente en los conejos utilizados para la producción de los sueros hiperinmunes.

b. Producción de Antisuero.

Para la producción de antisueros se utilizaron 10 conejos machos de 3 meses de edad de la raza Nueva Zelanda. Los conejos fueron sangrados antes de empezar con el programa de inoculación para ser usados como sueros control. El programa de inmunización fue el mismo en todos los animales y se muestra en el Cuadro 4. Dos semanas después de la última inoculación se efectuó un sangrado de prueba para probar el efecto inhibitorio del antisuero con los cultivos homólogos de micoplasmas. Cuando los antisueros presentaron resultados satisfactorios los animales fueron sangrados en blanco.

Los sueros hiperinmunes se esterilizaron por filtración y se distribuyeron en viales a razón de 0.5 ml y se almacenaron a -70. C.

Estos antisueros fueron utilizados para la identificación de los aislamientos de micoplasma por medio de las pruebas de inhibición de crecimiento y de inmunofluorescencia indirecta.

6. Procedimiento para la Prueba de Inhibición de Crecimiento.

Se impregnaron discos de papel filtro absorbente estériles de 6 mm de diámetro con 25 μ l de los antisueros hiperinmunes. Se inocularon placas de medio sólido con 0.1 ml de cada uno de los aislamientos a -

CUADRO No. 4

PROGRAMA DE INMUNIZACION PARA LA OBTENCION DE
SUEROS HIPERINMUNES CONTRA MICOPLASMAS

Día	Dosis	Vía o ruta de Inmunización
0	Sangrado Inicial 1 ml de Ag + 1 ml de ACF * 1 ml de Ag	Intramuscular Subcutánea
4	1 ml de Ag + 1 ml de AIF **	Intramuscular
8	1 ml de Ag + 1 ml de AIF	Intramuscular
12	1 ml de Ag + 1 ml de AIF 1 ml de Ag	Intramuscular Subcutánea
16	1 ml de Ag + 1 ml de AIF	Intramuscular
31	1 ml de Ag	Intravenosa
35	2 ml de Ag Sangrado de Prueba	Intravenosa
40	3 ml de Ag	Intravenosa
46	Sangrado en blanco	

ACF* = Adyuvante Completo de Freund
AIF** = Adyuvante Incompleto de Freund

identificar contenido 10^5 UFC/ml, distribuyéndose uniformemente en la superficie de la placa con el asa, la placa se dejó a temperatura hasta que la humedad del inóculo fue absorbido por el medio. Los discos con el antisuero se colocaron sobre la superficie de agar inoculada con la ayuda de pinzas esterilizadas. Las placas fueron incubadas a 37°C por 3 días en una cámara húmeda. Después de este tiempo de incubación la ausencia de crecimiento alrededor del disco conteniendo el antisuero identificó el aislamiento desconocido como relacionado con la especie que representa ese antisuero.

7. Procedimiento de Inmunofluorescencia Indirecta.

Se inocularon placas de Friis las cuales fueron incubadas a 37°C por dos días en cámara húmeda con baja tensión de O_2 . De estas placas se cortaron bloques de agar con un bisturí estéril que fueron colocadas sobre un portaobjetos con las colonias hacia arriba y tratando de evitar la formación de burbujas entre el portaobjetos y el bloque de agar. Alrededor de estos bloques se aplicó una mezcla caliente (50°C) de parafina 65% y vaselina 35% para prevenir que los bloques se desprendieran. Se colocaron de 2 a 3 gotas de antisuero y posteriormente se incubó a 37°C por 30 minutos en cámara húmeda o en una incubadora humidificada. Después de este tiempo de incubación se procedió a hacer dos lavados con buffer tris salino (pH 7.3 tris 0.01 M y NaCl 0.14 M) por 10 a 15 minutos cada lavado, para ello los portaobjetos se colocaron en cajas de tinción conteniendo el buffer y empleando agitación magnética suave para quitar el exceso de antisuero. Posteriormente se colocaron dos gotas de la antigamaglobulina de conejo producida en cabras y marcada con fluoresceína (Lab. Hoeschst) incubándose a 37°C bajo las mismas

condiciones y lavando nuevamente tres veces con la solución buferada. El exceso de líquido se eliminó con papel absorbente, teniendo cuidado de no secar la preparación, esta fue montada colocando una gota de PBS glicerinado (1 vol de PBS 0.01M pH 7.2 y 9 vols. de glicerol) sobre los bloques de agar y cubriendo con un portaobjetos. Las preparaciones se observaron en un microscopio de epifluorescencia.

Como controles negativos se utilizaron preparaciones de bloques de agar con las colonias de las cepas a identificar a las cuales se les colocó unas gotas del suero obtenido antes de la inmunización, se lavaron y tiñeron con el conjugado como se describió anteriormente. Esta preparación fue usada como un control para determinar cualquier reacción inespecífica. El control positivo se preparó a partir de bloques de agar con las colonias de las cepas de referencia haciéndolas reaccionar con su suero homólogo y tratados de la misma forma que las otras preparaciones. La prueba se efectuó usando antisueros no diluidos y diluidos 1:10, 1:20, 1:40 y 1:80.

8. ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados obtenidos en el estudio bacteriológico y aislamiento de micoplasmas tanto de pulmones normales como de pulmones neumónicos, fueron sometidos a un análisis estadístico de χ^2

La prueba de χ^2 permite determinar si existe o no diferencia entre las frecuencias de aislamiento de pulmones normales y de pulmones neumónicos. Sobre la hipótesis de que la proporción o frecuencia de aislamientos de una bacteria en particular o micoplasmas sea mayor en los casos neumónicos que en los casos de pulmones normales.

Para determinar si la proporción (P) de aislamientos en el número de casos de casos neumónicos o no neumónicos difiere de la proporción poblacional (p) esperada de aislamientos para ambos casos, se comparan las frecuencias observadas y esperadas, de estas comparaciones se deriva una medida -- llamada χ^2 (ji cuadrada), que es una medida de la diferencia global entre las frecuencias observadas y esperadas.

En los casos estudiados solo dos sucesos pudieron ocurrir, el aislamiento (A_1) y el no aislamiento (A_2) con probabilidades p y q=1-p respectivamente. Un valor muestral específico de la variable aleatoria $X=nP$ se llama frecuencia observada para el suceso A_1 , en tanto que np se llama la frecuencia esperada o teórica

Suceso	A_1	A_2
frecuencia observada	X_1	X_2
frecuencia esperada	nP_1	nP_2

donde $X_1 = X$ que es la variable asociada con los aislamientos y $X_2 = n - X_1$ es la variable aleatoria asociada con "no aislamientos"

La formula utilizada para medir las discrepancias o diferencias entre frecuencias observadas y esperadas esta dada por:

$$\chi^2 = \frac{(X_1 - np_1)^2}{np_1} + \frac{(X_2 - np_2)^2}{np_2} + \dots + \frac{(X_k - np_k)^2}{np_k}$$

$$= \sum_{j=1}^k \frac{(X_j - np_j)^2}{np_j}$$

Despu es de haber determinado el valor de χ^2 para cada caso particular, se consulta una tabla estadística de la distribución de χ^2 para determinar si el valor obtenido era o no significativo a los niveles de significación de 0.05 y 0.01

IV. RESULTADOS.

A. Estudio Patológico e Histológico.

De las 286 muestras de pulmones colectados se consideraron como neumónicos 68 de estos de acuerdo con el examen histopatológico, tomándose como normales o con cambios leves e inespecíficos las 218 muestras restantes.

Las lesiones que se observaron en la mayor parte de los pulmones neumónicos fueron áreas de consolidación roja y gris localizadas en los lóbulos pulmonares craneoventrales pero principalmente en los craneales.

El estudio histopatológico practicado a las 68 muestras de pulmones neumónico mostró: 17.5% de neumonías exudativas, 17.5% de neumonías mixtas 11% de neumonías proliferativas, 16% de neumonías abscedativas, 10% de neumonías parasitarias y 26.4% de pulmones neumónicos sin cambios patológicos aparentes.

En los casos de neumonías exudativas las lesiones se encontraron distribuidas en los lóbulos craneoventrales en los que se observaron zonas de consolidación que iban de roja a gris. Microscópicamente se observó exudado con infiltración de polimorfonucleares, fibrina, edema, y sangre en el lumen bronquiolar y alveolar.

En las neumonías proliferativas se observó engrosamiento de la pleura principalmente en los lóbulos caudales y las características principales observadas al microscopio fueron: la proliferación de nódulos linfoides perivasculares y peribronquiales.

En las neumonías mixtas las lesiones se encontraron confinadas en los lóbulos pulmonares craneoventrales en los cuales se observó consolidación que iba de roja a gris y diferentes grados de pleuritis extendiéndose en algunos casos hasta los lóbulos caudales. El estudio microscópico mostró exudado purulento, proliferación linfoide a nivel peribronquial y perivascular, presencia de macrófagos alveolares, moco y fibrina a nivel alveolar y bronquiolar. En algunos casos se observó hiperplasia del epitelio bronquiolar, acompañada de epitelización alveolar.

En las neumonías abscedativas los abscesos se encontraron situados principalmente en el parénquima pulmonar y variaron de tamaño - desde microscópicos hasta más de 7 cm.

En las neumonías parasitarias se encontraron parasitos subpleurales localizados principalmente en los lóbulos caudales de los pulmones, se observó engrosamiento de las paredes alveolares, formaciones granulomatosas subpleurales, hiperplasia de la musculatura lisa e infiltración de células mononucleares.

B. Estudio Bacteriológico.

Se aisló una gran variedad de géneros bacterianos tanto de pulmones neumónicos como de pulmones normales. Sin embargo, el análisis estadístico de χ^2 mostró que había diferencia significativa para Escherichia coli, Branhamella ovis, Pasteurella multocida, Pasteurella haemolytica, Corynebacterium ovis y Micoplasmas (Cuadro 5).

En el Cuadro 6 se muestra el porcentaje y frecuencia de aislamientos en los diferentes tipos de neumonías, observándose que en los casos de neumonías exudativas Escherichia coli, Branhamella ovis, Micrococcus roseus y Corynebacterium ovis fueron las más aisladas

CUADRO No. 5
 AISLAMIENTO MAS FRECUENTES DE PULMONES NEUMONICOS
 Y NORMALES O SIN CAMBIO PATOLOGICO

Microorganismos	Pulmones normales 218	Pulmones neumónicos 68	χ^2
<i>Micrococcus luteus</i>	12.3 %	17.65 %	n.s.
<i>Escherichia coli</i>	15.6 %	20.9 %	++
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	9.5 %	8.8 %	n.s.
<i>Branhamella ovis</i>	2.3 %	20.6 %	++
<i>Branhamella catarrhalis</i>	5.04%	4.4 %	n.s.
<i>Micrococcus roseus</i>	2.3 %	16.2 %	++
<i>Streptomyces s.p.</i>	3.7 %	2.9 %	n.s.
<i>Rodotorula s.p.</i>	1.37%	5.9 %	n.s.
<i>Pasteurella multocida</i>	0.9 %	4.4 %	+
<i>Pasteurella haemolytica</i>	0.5 %	7.35 %	+
<i>Corynebacterium bovis</i>	1.83%	2.9 %	n.s.
<i>Mycoplasma s.p.</i>	5.97%	17.6 %	+
<i>Corynebacterium ovis</i>	3.6 %	13.2 %	+

n.s. No significativo (P 0.05)

++ Altamente significativo (P 0.01)

+ Significativo (P 0.05)

CUADRO No. 6

Neumonías
(68 casos = 100 %)

Porcentaje y frecuencia de aislamientos
bacterianos de los diferentes tipos de
neumonías

	FRECUENCIA	PORCENTAJE
Neumonías exudativas (12 casos = 17.5%)		
<u>Escherichia coli</u>	8	11.7 %
<u>Branhamella ovis</u>	3	4.4
<u>Micrococcus roseus</u>	3	4.4
<u>Corynebacterium ovis</u>	3	4.4
<u>Mycoplasma</u>	2	2.9
Neumonías proliferativas (8 casos = 11%)		
<u>Escherichia coli</u>	7	10.29 %
<u>Micrococcus roseus</u>	2	2.9
<u>Branhamella ovis</u>	1	1.4
<u>Mycoplasma</u>	3	4.4
<u>Pasteurella multocida</u>	1	1.4
<u>Corynebacterium ovis</u>	3	4.4
Neumonías mixtas (12 casos = 17.5%)		
<u>Escherichia coli</u>	2	2.9 %
<u>Branhamella ovis</u>	2	2.0
<u>Mycoplasma</u>	3	4.4
<u>Pasteurella haemolytica</u>	1	1.4
Presencia de abscesos (11 casos = 16%)		
<u>Corynebacterium ovis</u>	4	5.8 %
<u>Branhamella ovis</u>	4	5.8
<u>Mycoplasma</u>	2	2.9
<u>Escherichia coli</u>	4	5.8
<u>Pasteurella haemolytica</u>	3	4.4
Neumonías parasitarias (7 casos = 10%)		
<u>Microcococcus roseus</u>	1	1.4 %
<u>Mycoplasma</u>	1	1.4

En las neumonías proliferativas las bacterias más frecuentemente aisladas fueron Escherichia coli, Micoplasmas y Corynebacterium ovis, mientras que en los casos de neumonías mixtas se aislaron Micoplasmas, Branhamella ovis y Escherichia coli y en las neumonías abscedativas Corynebacterium ovis, Branhamella ovis y Escherichia coli.

C. Aislamiento de Micoplasmas.

Se obtuvieron un total de 27 aislamientos de micoplasmas tanto de pulmones normales como de pulmones neumónicos. Once de estos aislamientos pertenecieron a las 68 muestras de pulmones neumónicos (17.6%) y 16 a las muestras de pulmones normales (7.3%).

El aislamiento de micoplasmas mostró ser significativo en los casos de pulmones neumónicos al aplicarse el análisis estadístico de χ^2 ($p < 0.05$).

1. Identificación de los aislamientos de Micoplasmas.

Los aislamientos de micoplasmas se diferenciaron de las formas "L" bacterianas empleando la tinción de Dienes y por subcultivo en medios de cultivo desprovistos de penicilina.

Se realizaron cionaciones con cada uno de los aislamientos para posteriormente efectuar la prueba de dependencia de esteroides utilizando digitonina al 1.5%. Los resultados de esta prueba se muestran en el Cuadro 7 y de acuerdo con ellos todos los aislamientos fueron clasificados dentro del género Mycoplasma.

Los resultados obtenidos con las pruebas de fermentación de los azúcares probados como fueron: glucosa, sorbitol, xilosa, galactosa y fructosa se muestran en el Cuadro 8. Considerando estos resultados,

CUADRO No. 7

RESULTADO DE LA PRUEBA DE DEPENDENCIA DE ESTEROLES

Número de aislamientos	Area de inhibición con Digitonina al 1.5% (mm de diámetro)	Resultado
23	18	Mycoplasma
4	20	Mycoplasma

las cepas aisladas fueron agrupadas en 6 grupos de acuerdo a sus reacciones hacia los azúcares probados.

Los resultados de las pruebas de hidrólisis de arginina y lisina así como su derivado ornitina se muestran en el Cuadro 9 junto con otras características observadas en los aislamientos como fueron: la producción de película y manchas y la producción de peróxido de hidrógeno.

Los resultados obtenidos con las pruebas bioquímicas efectuadas se compararon con las reacciones bioquímicas reportadas para las especies y serogrupos de micoplasmas de origen ovino y caprino (Cuadro 3) así como con las reacciones bioquímicas observadas con las cepas de referencia.

Debido a que en los estudios de clasificación e identificación de micoplasmas se consideran practicamente los criterios de fermentación de la glucosa e hidrólisis de la arginina para agrupar a los micoplasmas de acuerdo a sus reacciones bioquímicas, se consideraron estos criterios y se encontró que los aislamientos de micoplasmas pertenecen al grupo de micoplasmas que no fermenta la glucosa y no hidroliza la arginina ya que la mayoría de ellos mostró ser incapaz de fermentar la glucosa y algunos mostraron una reacción dudosa hacia este azúcar, por otro lado, la reacción observada practicamente en todos los aislamientos hacia la hidrólisis de la arginina fue negativa.

Se observó que todas las cepas aisladas son formadoras de película y manchas y productoras de peróxido de hidrógeno.

Los resultados de las pruebas serológicas efectuadas a los aislamientos para su identificación como fueron: La inhibición de crecimiento e Inmunofluorescencia indirecta se muestran en los Cuadro 10 y 11.

CUADRO No. 8

PRUEBAS DE FERMENTACION DE AZUCARES

Número de aislamientos	Glucosa	Sorbitol	Xilosa	Galactosa	Fructuosa
6	(+)	+ 0 (+)	+	- 0 (+)	(+) 0 -
2	-	(+)	+	(+)	- 0 (+)
8	(+)	-	+	- 0 (+)	+ 0 -
8	-	- 0 (+)	+	- 0 (+)	- 0 (+)
2	-	-	-	+	-
1	-	-	-	-	-

(+) Reacción Débil

CUADRO No. 9

PRUEBAS DE HIDROLISIS DE AMINOACIDOS, PELICULA Y MANCHAS Y PRODUCCION DE H_2O_2

Número de aislamiento	Arg.	Orn.	Lis.	Péliculas y Manchas	H_2O_2
25	-	-	-	+	+
2	(+)	-	-	+	+

(+) Reacción débil

Se encontrarón que todos los aislamientos eran inhibidos por el antisue-
ro de Mycoplasma caprino serogrupo 7 de Al-Aubaidi y en la prueba de IFI
también se observó relación serológica con este antisuero y con los ais-
lamientos.

En el cuadro 12 se muestran los resultados del análisis histo-
patológico y bacteriológico de las muestras de pulmones a partir de los
cuales se aislaron micoplasmas, tanto para pulmones en los que no se ob-
servaron cambios histológicos significativos o normales como para pul-
mones neumónicos.

El Cuadro 13 muestra los porcentajes y frecuencia de aislamien-
tos bacterianos de los pulmones neumónicos a partir de los cuales se ais-
laron micoplasmas.

En los Cuadros 14, 15, 16 y 17 se muestran las bacterias aso-
ciadas con los diferentes tipos de neumonías de donde fueron aislados
micoplasmas, así como de pulmones en los que no se observaron cambios
patológicos aparentes.

CUADRO No. 10

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO

Cepas probadas	A N T I S U E R O S				
	<u>M. mycoides var capri</u>	<u>M. ovipneumoniae</u>	<u>M. capricolium</u>	Grupo 5	Grupo 7
27 cepas aisladas	0	0	0	0	+
<u>M. mycoide var capri</u>	+	0	0	0	0
<u>M. ovipneumoniae</u>	0	+	0	0	0
<u>M. capricolium</u>	0	0	+	0	0
GRUPO 5	0	0	0	+	0
GRUPO 7	0	0	0	0	+

CUADRO No. 11
RESULTADO DE LA PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Cepas probadas	A N T I S U E R O S				
	<u>M. mycoides var. capri.</u>	<u>M. ovipneumoniae</u>	<u>M. capricolium</u>	GRUPO 5	GRUPO 7
27 cepas aisladas	0	0	0	0	+
<u>M. mycoides var capri</u>	+	0	0	0	0
<u>M. ovipneumoniae</u>	0	+	0	0	0
<u>M. capricolium</u>	0	0	+	0	0
GRUPO 5	0	0	0	+	0
GRUPO 7	0	0	0	0	+

CUADRO No. 12

1	TIPO DE NEUMONIA DE DONDE FUE AISLADO EL MICOPLASMA	BACTERIAS ASOCIADAS
1	SCPA*	Branhamella ovis, Escherichia coli
2	NH	Micrococcus luteus
3	NH	Escherichia coli
4	SCPA	Corynebacterium ovis, Streptococcus s.p., E. coli
5	SCPA	B. ovis, Staphylococcus epidermidis, Corynebacterium s.p.
6	SCPA	NHCB**
7	SCPA	NHCB
8	SCPA	NHCB
9	SCPA	NHCB
10	SCPA	B. ovis
11	SCPA	E. coli
12	NH	P. multocida
13	SCPA	B. ovis
14	SCPA	Klebsiella ozoenae, E. coli, Pasteurella haemolytica
15	SCPA	B. ovis
16	Proliferativa	M. luteus, S. epidermidis
17	Exudativa	E. coli, M. luteus, C. ovis
18	Exudativa	M. luteus, C. ovis
19	Exudativa	Staphylococcus aureus, S. epidermidis, C. ovis, M. luteus
20	Mixta	E. coli, Micrococcus luteus, Citrobacter s.p.
21	Proliferativa	E. coli, Streptococcus s.p., Citrobacter Koseri
22	Proliferativa	Klebsiella ozoenae, C. ovis
23	SCPA	B. ovis
24	Mixta	B. ovis, C. ovis
25	Parasitosis	M. luteus
26	Exudativa	B. ovis, C. ovis
27	SCPA	B. ovis, Acinetobacter anitratus

*SCPA = Sin cambio Patológico Aparente

°NH = No se hizo

**NHCB = No hubo Crecimiento Bacteriano

CUADRO No. 13
 Porcentajes y Frecuencias de Bacterias Encontradas
 en los Casos de Pulmones Neumónicos de los Cuales
 se Aislaron Micoplasmas

Bacteria	Frecuencia	Porcentaje
<i>Corynebacterium ovis</i>	6	22.2%
<i>Micrococcus luteus</i>	5	18.5%
<i>Escherichia coli</i>	3	11.1%
<i>Branhamella ovis</i>	2	7.4%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	7.4%
<i>Citrobacter Koseri</i>	2	7.4%
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	3.7%
<i>Acinetobacter anitratus</i>	1	3.7%
<i>Streptococcus s.p.</i>	1	3.7%
<i>Klebsiella ozoenae</i>	1	3.7%

CUADRO No. 14

BACTERIAS ASOCIADAS CON PULMONES QUE PRESENTABAN NEUMONIA PROLIFERATIVA A PARTIR DE LOS CUALES SE AISLARON MICROPLASMAS

Branhamella ovis	1
Escherichia coli	1
Streptococcus s.p.	1
Citrobacter koseri	1
Klebsiella ozaenae	1
Corynebacterium ovis	1

CUADRO No. 15

BACTERIAS ASOCIADAS CON PULMONES QUE PRESENTABAN NEUMONIA MIXTA A PARTIR DE LOS CUALES SE AISLARON MICROPLASMAS

Escherichia coli	1
Micrococcus luteus	1
Citrobacter s.p.	1
Branhamella ovis	1
Corynebacterium ovis	1

CUADRO No. 16

BACTERIAS ASOCIADAS CON PULMONES QUE NO MOSTRARON CAMBIOS PATOLOGICOS SIGNIFICATIVOS A PARTIR DE LOS CUALES SE AISLO MICOPLASMA

<i>Branhamella ovis</i>	5
<i>Escherichia coli</i>	5
<i>Acinetobacter anitratus</i>	2
<i>Corynebacterium ovis</i>	1
<i>Streptococcus s.p.</i>	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1
<i>Klebsiella ozoenae</i>	1
<i>Pasteurella haemolytica</i>	1

CUADRO No. 17

BACTERIAS ASOCIADAS CON PULMONES QUE PRESENTABAN NEUMONIAS EXUDATIVA A PARTIR DE LOS CUALES SE - AISLO MICOPLASMA

<i>Micrococcus luteus</i>	4
<i>Corynebacterium ovis</i>	4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2
<i>Escherichia coli</i>	1
<i>Acinetobacter anitratus</i>	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	1
<i>Branhamella ovis</i>	1

V. D I S C U S I O N

Las lesiones neumónicas que se observaron en la mayoría de los pulmones muestreados eran áreas de consolidación roja-gris localizadas en los lóbulos caraneo-ventrales. Estas observaciones concuerdan con las hechas por Ciprian, en su estudio de aislamiento y caracterización de micoplasmas a partir de pulmones neumónicos de ovinos y caprinos (24)

Este tipo de localización se relaciona con infecciones bacterianas y por micoplasmas. Esto es debido, a que dadas las ramificaciones bronquiales, las partículas inspiradas se impactan preferentemente en los lóbulos craneo-ventrales o anteriores. Además, el depósito de partículas inspiradas en diferentes partes del aparato respiratorio depende, en gran medida del tamaño de éstas. Y son los microorganismos cuyo tamaño queda comprendido entre 0.5 y 2 μ m (bacterias y micoplasmas) los que pueden franquear los mecanismos de defensa específicos e inespecíficos del aparato respiratorio superior y logran llegar hasta la pared del alveolo. (53).

Se ha considerado que muchos de los problemas respiratorios son resultado de la interacción secuencial de factores ambientales-agentes virales- microorganismos intermedios (micoplasmas o clamidias) y bacterias

Este complejo neumónico afecta fundamentalmente a animales jóvenes en los cuales la enfermedad toma un curso agudo y puede presentarse en forma inaparente o con signos leves de bronconeumonía en animales a--

adultos en los que la enfermedad toma, generalmente, un curso crónico. La lesión crónica representa un proceso secundario donde la primoinfección viral ha sido reemplazada por el proceso bacteriano secundario. Las bacterias representan la última etapa de la secuencia neumónica y son las responsables, en muchas ocasiones, de las lesiones neumónicas graves (89)

Se considera que el muestreo a nivel de rastro detecta principalmente problemas respiratorios de curso crónico, dado que los animales sacrificados en estos sitios son en su mayoría animales adultos en los que se pueden o no observar signos leves de bronconeumonía y retraso en el crecimiento.

Debido a lo anterior se considera que las 68 muestras de pulmones neumónicos estudiadas procedían de animales afectados crónicamente. El estudio practicado a estas muestras reveló diferentes tipos de neumonías de las cuales las que se presentaron con mayor frecuencia fueron las neumonías exudativas, mixtas, proliferativas y abscedativas.

De los géneros bacterianos aislados tanto de pulmones normales como de pulmones neumónicos se encontró que el aislamiento de Escherichia coli, Branhamella ovis, Pasteurella multocida, Pasteurella haemolytica, Corynebacterium ovis y Micoplasmas era significativo para los casos neumónicos. Lo cual sugiere que estas bacterias pudieran estar involucradas en los procesos neumónicos de las cabras

El porcentaje de aislamientos de micoplasmas obtenidos de pulmones neumónicos (17.6%) mostró ser significativo ($P < 0.05$) cuando se compa

ró con el porcentaje de aislamientos de pulmones normales (7.3%), ello sugiere que los micoplasmas pudieran tener un papel relevante dentro del proceso neumónico caprino. Ya que, además, éstos fueron aislados de diferentes tipos de neumonía. El porcentaje de aislamientos obtenido de pulmones neumónicos fue un poco más alto que el encontrado por Ciprián en su estudio de aislamiento y caracterización de micoplasmas a partir de neumonías de cabras, donde él reporta, un porcentaje de aislamientos de 10.8% (24). Es probable que esta diferencia se deba al criterio utilizado por este autor al seleccionar únicamente aquellas muestras que presentaban lesión neumónica primaria. No así, aquí, donde el exámen histopatológico de las muestras neumónicas reveló diferentes tipos de neumonías. Sin embargo, el mayor número de aislamientos de micoplasmas fueron a partir de neumonías proliferativas y mixtas.

Tanto los micoplasmas aislados de pulmones neumónicos como de -- pulmones normales pertenecen a un grupo homogéneo en cuanto a sus características bioquímicas y serológicas observadas. Serológicamente estos aislamientos mostraron estar relacionados con el *Mycoplasma caprino* del grupo 7 perteneciente a los serogrupos de Al-Aubaídi y presentaron algunas reacciones bioquímicas en común con la cepa tipo del grupo 7, como fueron: la incapacidad para fermentar glucosa e hidrolizar arginina. Sin embargo, los aislamientos presentaron otras características bioquímicas que no se observaron ni han sido reportadas con *M. caprino* del grupo 7, éstas características son la formación de película y manchas y la producción de peróxido de hidrógeno (46). Las características anteriormente mencionadas han sido reportadas también con *M. agalactiae*, cuyas reacciones bioquímicas hacia la glucosa y arginina son negativas al igual que la de los aislamien-

tos (46). Sin embargo la agalactia contagiosa de ovejas y cabras en México no ha sido reportada.

Y aunque bioquímicamente los micoplasmas aislados están más cercanamente relacionados con M. agalactiae, serológicamente no se pudo demostrar si existía o no alguna relación con esta especie y los aislamientos, debido a que no se contaba con una cepa de referencia de M. agalactiae, ni con un antisuero de esta especie para haber realizado algunas pruebas serológicas o algún otro tipo de análisis.

La cepa de referencia que representa al serogrupo 7 fue aislada de pulmones de cabra por Doza y parece ser que es el único aislamiento que se ha hecho de este serogrupo (citado en (46))

Aunque los micoplasmas se aislaron de diferentes tipos de neumonías así como de pulmones que no presentaban cambios significativos el aislamiento de estos resultó ser significativo para los pulmones neumónicos lo que sugiere que estos aislamientos pudieran estar realmente involucrados dentro del proceso neumónico caprino. Debido a que éstos se aislaron de diferentes tipos de neumonías, según indica el análisis histopatológico. Las lesiones que éstos producen no fueron determinadas, ya que en todos los casos se encontraron acompañados de otras bacterias, las cuales podrían estar involucradas en el proceso patológico observado y que hizo difícil precisar el daño causado por los micoplasmas.

Por otra parte, se ha considerado a la producción de peróxido de hidrógeno, por parte de algunas especies de micoplasmas, como un factor involucrado en la patogénesis de éstos, y éste factor ha mostrado ser citotóxico - tanto para células del epitelio respiratorio como para glóbulos rojos (51) - (26). Y ésta actividad productora de peróxido de hidrógeno se encontró en todos los aislamientos obtenidos lo cual indica que éstos micoplasmas realmente podrían estar involucrados dentro del proceso neumónico caprino.

En cuanto a los géneros bacterianos que se encontraron en los casos donde se aisló micoplasmas no se mostró una asociación particular; sin embargo, las bacterias que más se aislaron fueron Corynebacterium ovis, Micrococcus luteus, Escherichia coli y Branhamella ovis.

Los micoplasmas aislados fueron diferentes a las especies encontradas por Ciprian en su estudio de caracterización de micoplasmas aislados de pulmones neumónicos de cabras en donde se aisló M. arginini, M. ovipneumoniae y cepas de micoplasmas no caracterizadas (24).

Se puede considerar que los micoplasmas juegan un papel importante dentro del proceso neumónico caprino, como lo indican los hechos de que fueron aislados de diferentes tipos de neumonías y el que su aislamiento de pulmones neumónicos sea significativo; así como, el que presenten actividad productora de peróxido de hidrógeno que ha mostrado ser citotóxica para las células del epitelio respiratorio.

Desafortunadamente la identificación total de estos micoplasmas no se logró y resultaría conveniente intentar otras pruebas serológicas u otros tipos de análisis que permitan identificarlos plenamente, principalmente buscando la posibilidad de si existe o no relación serológica entre estos aislamientos y Mycoplasma agalactiae.

Se podría pensar que el papel que juegan los micoplasmas en el proceso neumónico caprino sea como un factor predisponente que facilita la invasión secundaria por otros microorganismos del tejido pulmonar. Sin embargo, es necesario investigar más sobre el papel exacto que juegan los micoplasmas dentro del proceso neumónico caprino.

VI. CONCLUSIONES.

1. El examen histopatológico de las muestras neumónicas, de donde fueron aislados los micoplasmas, reveló diferentes tipos de neumonías. Sin embargo, el mayor número de aislamientos fueron a partir de neumonías proliferativas y mixtas.
2. Los micoplasmas que fueron aislados en este trabajo pertenecen a un grupo homogéneo en cuanto a sus características bioquímicas y serológicas observadas; pero no se pudo llegar a una caracterización definitiva, por lo que deberán ser investigados mayormente.
3. Los micoplasmas en cabras pueden considerarse como flora normal y el hecho de que se presenten en un cuadro neumónico dependerá de un sin número de circunstancias que favorezcan su proliferación.
4. De acuerdo con el análisis estadístico realizado se sugiere que dentro del proceso neumónico caprino, los micoplasmas pueden actuar como agentes predisponentes que facilitan la invasión o colonización secundaria por otros microorganismos.

VII. BIBLIOGRAFIA.

1. Al-Aubaidi, J.M., Dardiri, A.H., Fabricant, J., 1972. Biochemical characterization and antigenic relationship of Mycoplasma mycoides subspecies mycoides and Mycoplasma mycoides subspecies capri. Int. J. Syst. Bacteriol 22: 155-164.
2. Al-Aubaidi, J.M., and Jasper, D.E., 1972. Agar block technique for identification of mycoplasmas by use of fluorescent antibody - Appl. Microbiol. 23: 1097-1100
3. Al-Aubaidi, J.M., Taylor, W.D., Bubash, G.R. and Dardiri, A.H., 1972. Identification and characterization of Mycoplasma arginini from bighor sheep (ovis canadensis) and goats. Amer. J. Vet. Res. 33: 87-90
4. Alley, M.R., Quinlan, J.R. and Clarke, J.K., 1975. The prevalence of Mycoplasma ovipneumoniae and Mycoplasma arginini in the respiratory tract of sheep N.Z. Vet. J. 23: 137-141.
5. Aluja, A.S., 1964. Un brote de pleuroneumonía en cabras causado por - Mycoplasma mycoides. Med. Vet. Zoot. III: 77-87.
6. Aluotto, B.B., Wittler, R.G., Williams, C.O. and Faber, J.E. 1970. - Standardized bacteriologic techniques for the characterization of Mycoplasma species. Int. J. Syst. Bact. 20: 35-38.
7. Andersen, H., Christiansen, G. and Christiansen, C., 1984. Electrophoretic Analysis of Proteins from Mycoplasma capricolum and - related serotypes using extracts from intact cells and from minicells containing closed mycoplasma DNA. J. Gen. Microbiol. 130: 1409-1418.
8. Banai, M., Kahane, I., Feldner, J. and Razin, S., 1981. Attachment of killed Mycoplasma gallisepticum cells and membranes to erythrocytes. Infection and Immunity 34 (2): 422-427.
9. Banerjee, M., Singh, N. and Gupta, P.P., 1979. Isolation of Mycoplasmas and Acholeplasmas from pneumonic lesions in sheep and - goats in India Zbl. Vet. Med. B. 26: 689-695.

10. Bak, A.L., Black, F.T., Christiansen, C. and Freundt, E.A., 1969. Genome Size of mycoplasmal DNA. Nature, London 224:1209-1210
11. Barber, T.L. and Yedloutschnig, R.J., 1970. Mycoplasma infections of goats. Cornell. Vet. 60:297-308
12. Barile, M.F., Delguiudice, R.A. and Tully, J.G., 1972. Isolation and characterization of Mycoplasma conjunctivae spec. nov. from sheep and goats with keratoconjunctivitis Infect. Immun. 5: 70-76
13. Bar-Moshe, B. and Rappaport, E., 1978. Contagious agalactia-like disease in goats caused by Mycoplasma mycoides subsp. mycoides - (ovine/caprine). Serogroup 8. Refuah Vet. 35(2):75-77
14. Bar-Moshe, B. and Rappaport, E., 1981. Observations on Mycoplasma mycoides subsp. mycoides infection in Saanen goats. Isr. J. Med. Sci. 17(7):537-539
15. Beaton, W.G., 1931. Diseases of goats in Nigeria. II. Notes on a fatal septicæmic infection. J. Comp. Path. Therap. 44(3):192-201
16. Borrel, A., Dujardin-Beaumetz, E., Jeantet, P. and Jovan, C., 1910. Le microbe de la peripneumonie. Ann. Inst. Pasteur 24:168-179
17. Boughton, E. and Thorns, C.J., 1976. Mycoplasma Laboratory Handbook, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food; Central Veterinary Laboratory: New Haw. Weybridge, Surrey England.
18. Bradbury, J.M., 1977. Rapid biochemical tests for characterization of the Mycoplasmatales. J. Clin. Microbiol. 5:531-534
19. Bradbury, J.M. and Mc Clenaghan, M., 1982. Detection of mixed Mycoplasma species. J. Clin. Microbiol. 16(2):314-318
20. Bridré, J. and Donatien, A., 1923. Le microbe de l'agalaxie contagieuse et sa culture in vitro C.R. Acad. Sci. (Paris) 177:841
21. Carmichael, L.E., ST. George, T.D., Sullivan, N.D. and Horsfall, N., 1972. Isolation, propagation and characterization studies

- of an ovine Mycoplasma responsible for proliferative interstitial pneumonia. Cornell Vet. 62: 654-679
22. Carter, G.R., 1975. Diagnostic Procedures in Veterinary Microbiology. Second edition, Charles C. Thomas Publisher. Springfield, Illinois, U.S.A.
 23. Christiansen, C. and Ernø, H., 1982. Classification of the F-38 group - of caprine mycoplasma strains by DNA hybridization. J. Gen. Microbiol. 128: 2523-2526
 24. Ciprian, C.A., 1978. Aislamiento y caracterización de micoplasmas de pulmones neumónicos de ovinos y caprinos en México. Tesis de Maestro en Ciencias. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-U.N.A.M.
 25. Cole, B.C., Golightly-Rowland, L., Ward, J.R. and Wiley, B.B., 1970. Immunological response of rodents to murine Mycoplasmas. Infect. Immun. 2: 419-425
 26. Cole, B.C., Ward, J.R. and Martin, C.H. 1968. Hemolysin and peroxidase activity of Mycoplasma species. J. Bacteriol. 95: 2022-2030
 27. Cordy, D.R., Adler, H.E. and Yamamoto, R., 1955. A pathogenic pleuropneumonia like organism from goats. Cornell Vet
 28. Cottew, G.S., 1970. Diseases of sheep and goats caused by mycoplasmas in Sharp, J.T.: The role of mycoplasmas and L-forms of bacteria in disease. Charles C. Thomas Publisher., Springfield Illinois. U.S.A. p. 198-211
 29. Cottew, G.S., 1979. Caprine-ovine mycoplasmas, in Tully, J.G., Whitcomb, R.F. (ed): The Mycoplasmas. II. Human and Animal Mycoplasmas. London, Academic. Press. pag.103-132
 30. Cottew, G.S., Lloyd, L.C., 1965. An outbreak of pleurisy and pneumonia in goats in Australia attributed to a Mycoplasma species. J.Comp. Path. 75: 363-374
 31. Cottew, G.S., Yeats, F.R., 1978. Subdivision of Mycoplasma mycoides - subspecies mycoides from cattle and goats into two types. - Aust. Vet. J. 54: 293-296

32. Cottew, G.S., Yeats, F.R., 1981. Occurrence of Mycoplasmas in Clinically normal goats. Australian Vet.J. 57: 52-53
33. Cottew, G.S., Watson, W.A., Erdag, O. and Arisoy, F., 1969. Mycoplasmas of caprine pleuropneumonia in turkey and their relationship to a other mycoplasmas of goats and Mycoplasma mycoides var mycoides. J. Comp. Pathol. 79(4):541
34. Cowan, S.T. y Steel, K.J., 1979. Manual para la identificación de bacterias de importancia médica. Compañía editorial Continental, S.A. Méx. D.F.
35. Crawford, Y.E. and Kraybill, W.H., 1967. The mixtures of Mycoplasma-species isolated from the human oropharynx. Ann. N.Y. Acad Sci. 143(1):411-421
36. Crawford, Y.E., Smith, P.F., Panos, C. and Lynn, R.J., 1967. Amicrobiol enigma mycoplasma and L-forms. In Panos, C. (ed)., --- World Publ. Co., Cleveland and New York.
37. Da Massa, A.J., 1983. Recovery of Mycoplasma agalactiae from mastitis goat milk. J. Am. Vet. Med. Ass. 183(5): 548-549
38. DeGiudice, R.A., Robillard, N.F. and Carski, T.R., 1967. Immunofluorescence identification of mycoplasmas on agar by use of incident illumination. J. Bacteriol. 93: 1205-1209
39. Dienes, L., 1960. Controversial aspects of the morphology of pleuropneumonia-like organisms. Ann. N.Y. Acad. Sci. 79 (10): -- 356-368
40. Dienes, L. and Bullivant, S., 1967. Comparison of the morphology of pleuropneumonia-like organisms and L-forms of bacteria with light and electron microscopy. Ann. N.Y. Acad. Sci. 143(1): 719-733
41. Domermuth, C.H., Nielsen, M.H., Freundt, E.A. and Birch-Andersen., - 1964. Ultrastructure of Mycoplasma species J. Bact. 88 (3):727.
42. Eaton, M.D. and Low, I.E., 1967. Propagation of Mycoplasma pneumoniae and other fastidious strains of P.P.L.O. Ann. N.Y. Acad Sci. 143 (1):375-383.

43. Edward, D.G., 1953. Organisms of the pleuropneumonia group causing - disease in goats. Vet. Rec. 49:873-875
44. Edward, D.G. and Freundt, E.A., 1956. The classification and nomen-
-clature of organisms of the pleuropneumonia group. J. Gen.
Microbiol. 14(1): 197-297
45. Edward, D.G. and Freundt, E.A., 1967. Proposal for Mollicutes as name
of the class established for the order Mycoplasmatales
Int. J. System. Bacteriol. 17 (3): 267-268
46. Ernø, H., Al-Aubaidi, J.M., Ojo, M.O., Minga, U.M. and Sikdar, A., -
1978. Identification and Identification of ovine and capri
ne Mycoplasmas. Acta Vet. Scand. 19:392-406
47. Fallon, R.J., Whittlestone, P., 1969. Isolation, Cultivation and Main
tenance of Mycoplasmas. In Norris, J.R. (ed), Methods in Micro-
biology vol 3 B. Academic Press, London and New York.
48. Foggie, A. and Angus, K.W., 1972. Observations on the distribution -
of Mycoplasma arginini as a Respiratory Tract Infection in
sheep and its Pathogenicity for specific pathogen free ---
lambs. Cornell Vet. 90:312-313
49. Freundt, E.A., Ernø, H. and Lemcke., 1979. Identification of Mycoplas
mas. In Bergan, T. and Norris, J.R.(ed), Methods in Micro-
biology vol 13. Academic Press, London
50. Friis, N.F., 1969. Mycoplasma suis pneumoniae isolated in Denmark. Ac-
ta Vet. Scand. 10: 295-297
51. Gabridge, M.G., Borden-Stahl, Y.D., Polisky, R.B. and Engelhardt. 1977
Differences in the attachment of Mycoplasma pneumoniae cel-
ls and membranes to tracheal epithelium. Infect. Immun. 16
766-772
52. Goni, M. and Onoviran, S. 1973. Contagious caprine pleuropneumoniae
a reassessment of the disease situation in Nigeria. Trop.
Anim. Hlth. Prod. 5:114-118
53. Green, G.M. 1971. In defence of the lung. Am. Rev. Resp. Dis. 102:691

54. Green, G.M., Jakab, G.J., Low, R.B. and Davis, G.S., 1977. Defense mechanisms of the respiratory membrane. Am. Rev. Resp. Dis. - 102: 691.
55. Gupta, M.M., Verma, B.B., 1984. Isolation and characterization of Mycoplasma from the respiratory tract of kids in Bihar. In. J. Anim. Sci. 54 (1): 58-62
56. Hooker, J.M., Smith, G.R. and Milligan, R.A., 1979. Differentiation of Mycoplasma mycoides subsp. mycoides from certain closely related caprine mycoplasmas by mycoplasmaemia and cross protection tests in mice. J. Hyg. Cambridge 82:407
57. Jasper, D.E. and Dellinger, J.D., 1979. Isolation of exotic mycoplasma from goats. Proc. Am. Ass. Vet. Lab. Diagn. 22: 119-124
58. Jonas, A.M. and Barber, T.L., 1969. Mycoplasma mycoides var capri isolated from a goat in Connecticut. J. Infect. Dis. 119: 126-131
59. Jones, G.E., 1983. Mycoplasmas of sheep and goats: A synopsis. Vet. Rec. 113:619-620
61. Jones, G.E., Rae, A.G., Holmes, R.G., Lister, S.A., Jones, J.M.W., Grater, G.S. and Richards, N., 1983. Isolation of exotic mycoplasmas from sheep in England. Vet. Rec. 113:540
60. Jones, G.E., Gilmour, J.S., Rae, A.G., 1985. Investigations into the possible role of Mycoplasma arginini in ovine respiratory disease. Res. Vet. Sci. 38: 368-372
62. Kaliner, G. and Mac Owan, K.J., 1976. The pathology of experimental - and natural contagious caprine pleuropneumonia in Kenya. - Zbl. Vet. Med. 23 B (8):652
63. Laws, L., 1956. A pleuropneumonia-like organism causing peritonitis in goats. Aust. Vet. J. 32: 326-329
64. Leach, R.H., 1970. The occurrence of Mycoplasma arginini in several - animals hosts. Vet. Rec. 87: 319-320
65. Liebermeister, K., 1960. Morphology of the pleuropneumonia-like orga

- nisms and L-forms of Proteus. Ann. N.Y. Acad. Sci. 79 (10) 326-343
66. Littlejohns, I.R. and Cottew, G.S., 1977. The Isolation and Identification of Mycoplasma mycoides subsp. capri from goats in - Australia. Australian Vet. J. 53:297-301
67. Lloyd, L.C., Buttery, S.H. and Hudson, J.R. 1971. The effect of the - galactan and other antigens of Mycoplasma mycoides on experimental infection with that organism in cattle. J. Med. - Microbiol. 4: 434-439
68. Longley, E.O., 1951. Contagious pleuropneumonia of goats. Ind. J. -- Vet. Sci. Anim. Husband. 10 (2):127-197
69. Mac Owan, K.J., 1976. A mycoplasma from chronic caprine pleuropneumonia in Kenya. Trop. Anim. Hlth. Prod. 8 (1):28-36
70. Mac Owan, K.J. and Minette, J.E., 1976. A mycoplasma from acute contagious caprine pleuropneumonia in Kenya. Trop. Anim. Hlth Prod. 8(2): 91-95
71. Mac Owan, K.J. and Minette, J.E., 1977. The role of mycoplasma strain F-38 in contagious caprine pleuropneumonia (CCPP) in Kenya. Vet. Rec. 101(19): 380.
72. Mac Owan, K.J. and Minette, J.E., 1977. Contact. Transmission of experimental contagious caprine pleuropneumonia (CCPP). Trop. - Anim. Hlth. Prod. 9(3):185-188
73. Maniloff, J., Morowitz, H.J. and Barrnett, R.J., 1965. Ultrastructure and ribosomes of Mycoplasma gallisepticum J.Bact. 90 -- (1):193-204
74. Maniloff, J., Morowitz, H.J. and Barrnett, R.J., 1965. Studies of -- the ultrastructure and ribosomal arrangement of the pleuropneumonia-like organism A 5969. J.Cell.Biol. 25: 139-150
75. Martin, W.B., 1979. Non Parasitic Respiratory Disease of sheep. In - the Management and Diseases of sheep. The British Council-Commonwealth Agriculture Bureaux, pag 277
76. • Martínez, B.J., Lopez, M.A. y Merino, M.M., 1986. Eliminación bacte-

riana pulmonar. Vet. Mex. 17:281

77. Maxted, W.R., 197 . Specific Procedures and Requirements for the Isolation, Growth and Maintenance of the L-phase of some Microbial groups. In Bergan, T. and Norris, J.R.(ed), Methods in Microbiology vol Academic press, London pag.
78. Mc Martin, D.A., Mac Owan, K.J.and Swift, L.L.,1980. A century of classical contagious caprine pleuropneumonia: from original -- description to aetiology. Br. Vet. J. 136: 507-514
79. Nasri, M. El., 1967. Mycoplasma from contagious caprine pleuropneumonia. Ann. N.Y.Acad. Sci. 143:298
80. Nicol, C.S. and Edward, D.G. 1953. Role of organisms of the pleuropneumonia group in human genital infections. Br. J. Vener. Dis. 29(3): 141-150
81. Nocard, E., Roux, E.R.borrel, Saliment and Dujardin-Beaumetz., 1898.- Le microbe de la peripneumoniae. Ann. Inst. Pasteur 12:240-262
82. Nowak, J., 1929. Morphologie, nature et cycle evolutif du microbe de la peripneumoniae des bovides. Ann. Inst. Pasteur 43: 1330-1352
83. Ojo,M.O., 1973. Isolation of two strains of mycoplasma serologically-closely related to Mycoplasma mycoides var mycoides from -- pneumonic lungs of goats. Bull. Epi. Dis. Afr. 21:319
84. Ojo, M.O., 1976. Caprine pneumonia IV. Pathogenicity of Mycoplasma mycoides subsp. capri and caprine strains of Mycoplasma mycoides subsp. mycoides for goats. J. Comp. Path. 86:519-525
85. Ojo, M.O., 1977. Caprine Pneumonia. Vet. Bull. 47 (8) 573-578
86. Pearson, J.E., Rokey, N.W., Harrington, R. 1972. Contagious caprine - pleuropneumonia in Arizona. J.Am.Vet.Med.Assoc. 161: 1536--1538
87. Perreau, P., 1979. Mycoplasmosse caprine a Mycoplasma mycoides subsp. mycoides en France. Bull. Acad. Vet. de France 52: 575-581

88. Perreau, P. and Breard, A. 1979. Caprine mycoplasmosis due to M. capricolum. Comp. Imm. Microb. Inf. Dis. 2 (1):87-97
89. Pijoan, A.C., 1976. Neumonía Enzootica de los Cerdos. Ciencia Vet. - vol. I. ed. Moreno, Chan. F.M.V.Z. de la U.N.A.M.
90. Pijoan, A.C. 1978. Infecciones mixtas del Aparato Respiratorio. En - Ciencia Vet. vol. 2. ed. Moreno, Chan. F.M.V.Z. de la U.N.A.M.
91. Ramírez, R. y Pijoan, A.C., 1976. Estudio sobre la incidencia de neumonias en ovinos y caprinos sacrificados en cinco rastros. Reunión Anual de Medicina Veterinaria en México
92. Razin, S. and Cohen, A. 1963. Nutritional requirements and metabolism of Mycoplasma laidlawii. J. Gen. Microbiol. 30(1):141-154
93. Razin, S. and Oliver, O., 1961. Morphogenesis of mycoplasma and bacterial L-form colonies. J. Gen. Microbiol. 24:225
94. Razin, S. and Rottem, S., 1967. Identification of Mycoplasma and other microorganisms by polyacrylamide gel electrophoresis of cell proteins. J. Bact. 94 (6): 1807-1810
95. Rhunke, H.L., Rosendal, S., Goltz, J. and Blackwell, T.E., 1983. Isolation of Mycoplasma mycoides subsp. mycoides from polyarthritis and mastitis of goats in Canada. Can. Vet. J. 24: 54-56
96. Roberts, D.H. and Pijoan, A.C., 1971. Identification of Mycoplasma hyorhinis. Br. Vet. J. 127: 552
97. Rosendal, S. and Black, F.T., 1972. Direct and Indirect immunofluorescence of unfixed and fixed mycoplasma colonies. Acta Path.-Microbiol. Scand. B. 80:615-622
98. Rosendal, S., Campbell, S.G., Matthews, G. and Valdivieso García, A., 1980. Serological diagnosis of infections caused by the large colony type of Mycoplasma mycoides subsp. mycoides. Proc
99. Rosendal, S., Ernø, H., Wyand, D.S., 1979. Mycoplasma mycoides subsp. mycoides as a cause of polyarthritis in goats. J. Am. Vet. Med. Assoc. 175: 378-380

100. Salih, M.M., Ernø, H. and Simonsen, V., 1983. Electrophoretic analysis of isoenzymes of Mycoplasma species. Acta Vet. Scand.-24: 14-33
101. Schimke, R.T. and Barile, M.F. 1963. Arginine metabolism in pleuropneumonia-like organism isolated from mammalian cell culture. J. Bact. 86 (2): 195-206
102. Shepard, M.C. and Lunceford, C.D. 1965. Effect of pH on human Mycoplasma strains. J. Bact. 89 (2):265-270
103. Shifrine, M. and Gourlay, R.N., 1965. The immediate type allergic -- skin reaction in contagious bovine pleuropneumonia. J. -- Comp. Path. 75: 381-385
104. Shirlaw, J.F., 1949. Studies on contagious pleuropneumonia of the goat in India. Ind. J. Vet. Sci. Anim. Husb. 19 (3):181
105. Singh, N., Rajya, B.S., Mohanty, G.C., 1974. Granular vulvovaginitis-(GVV) in goats associated with Mycoplasma agalactiae. Cornell Vet. 64: 435-442
106. Smith, G.R., Hooker, J.M. and Milligan, R.A., 1980. Further studies on caprine and ovine mycoplasmas related to Mycoplasma mycoides subsp. mycoides. J.Hyg. Camb. 85: 247
107. Smith, P.F., 1960. Aminoacid metabolism of PPL0. Ann.N.Y.Acad. Sci. 79 (10):543-550
108. Smith, P.F., 1963. The carotenoid pigments of mycoplasma. J.Gen. Microbiol. 32(3):265
109. Smith, P.F. and Henrikson, C.V., 1965. Comparative biosynthesis of mevalonic acid by mycoplasma. J. Bact. 89 (1): 146-153
110. Smith, P.F. 1971. The biology of Mycoplasmas. Ed. Academic press, N. York. and London pag.
111. Sobeslavsky, O., Prescott, B. and Chanok, R.M. 1968. Adsorption of Mycoplasma pneumoniae to neuraminic acid receptors of various cells and possible role in virulence. J. Bact. 96: 695-705

112. Solana, M.P. and Rivera, E., 1967. Infection of goats in México by Mycoplasma mycoides var capri. Ann. N.Y. Acad. Sci. 143:357-363
113. Solana, M.P. and Udave, L.M., 1966. Estudios epizootiologicos de la pleuropneumonia contagiosa de las cabras. Tec. Pec. en Méx.
114. St George, T.D. and Carmichael, L.E. 1975. Isolation of Mycoplasma -- ovipneumoniae from sheep with chronic pneumonia. Vet. Rec. 97: 205-206
115. Stone, S.S. and Tessler, M.S. 1974. Fluorescent labelling of antibody for identifying mycoplasma colonies by incident ultraviolet light. Am. J. Vet. Res. 35(1): 107
116. Sullivan, N.D., St George, T.D. and Hordfall, N. 1973. A proliferative interstitial pneumonia of sheep associated with mycoplasma infection: I. Natural history of the disease in a flock. Aust. Vet. J. 49:57-62
117. Stipkovits, L., Belák, S., Pálfy, V. and Tury, E., 1975. Isolation of Mycoplasma ovipneumoniae from sheep with pneumonia. Acta - Vet. Acad. Sci. Hung. 25 (2-3):267-273
118. Swanepoel, R., Efstratiou, S. and Blackburn, N.K., 1977. Mycoplasma-capricolum associated with arthritis in sheep. Vet. Rec. - 101 (22): 446-447
119. Thigpen, J.E., Kornegay, W.R., Chang, J., Mc Ghee, C.C., Thierry, V.L. 1981. Pneumonia in goats caused by Mycoplasma mycoides -- subsp. mycoides. J. Am. Vet. Med. Ass. 178 (7):711-720
120. Tourtellote, M.E., Morowitz, H.J. and Kasimer, P., 1964. Defined medium for Mycoplasma laidlawii. J. Bact. 88(1):11-15
121. Trigo, T.E., 1985. Mecanismos de defensa del pulmón. En "El pulmón de los mamíferos domésticos". Ed. por la Div. de Est. de Posgrado de la F.M.V.Z. de la U.N.A.M. pag. 71
122. Turner, A.W., 1935. A study of the morphology and life cycles of the organism of pleuropneumonia contagiosa (Borrelomyces peripneumoniae nov. ge.) by observations in the living state --

under dark ground illumination. J. Path. Bact. 41:1-32

123. Valdivieso, G.A., Rosendal, S., 1982. Variación en el tamaño de las colonias de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* aislada de cabras. Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaría en México, pag. 170-174
124. Van Demark, P.J. and Smith, P.F., 1965. Nature of butyrate oxidation by *Mycoplasma hominis*. J. Bact. 89(2): 373-377
125. Wallace, A. and Clyde, J., 1983. Growth inhibition tests. In *Methods in Mycoplasmology, Vol I. Mycoplasma Characterization* ed. by Razin, S. and Tully, G.J. by Academic Press, Inc.