

136

016642
25.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**PATOGENICIDAD DE MICOPLASMAS
INVOLUCRADOS EN LA MASTITIS BOVINA**

**T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE LA :
MAESTRIA EN CIENCIAS VETERINARIAS
(B A C T E R I O L O G I A)
P R E S E N T A :
MVZ. ROSA ELENA MIRANDA MORALES**

**TUTOR: DR. FRANCISCO TRIGO TAVERA
ASESOR: DR. FRANCISCO SUAREZ GUEMES**

MEXICO, D. F.

1999

**TESIS CON
FALLA DE COPIA**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

Dedicatorias	I
Agradecimientos	II
Índice	III
Resumen	IV
INTRODUCCIÓN	1
Antecedentes históricos	1
Generalidades de los micoplasmas	2
Mastitis por micoplasmas	6
Cuadro 1.1	9
Literatura citada	10
AÍSLAMIENTO Y TIPIFICACIÓN DE MICOPLASMAS A PARTIR DE MUESTRAS DE LECHE DE BOVINOS CON MASTITIS	
Introducción	13
Materiales y Métodos	15
Técnica de cultivo y subcultivos	15
Pruebas básicas de identificación	16
Identificación bioquímica de los aislados de micoplasmas	18
Tipificación serológica de los aislados de micoplasmas	19
Cuadro 2.1	22
Cuadro 2.2	23
Resultados	24
Figura 2.1	26
Figura 2.2	26
Discusión	27
Literatura citada	33
ADHERENCIA Y DAÑO CELULAR DE UNA CEPA DE MICOPLASMA AISLADA DE BOVINOS CON PROBLEMAS DE MASTITIS	
Introducción	37
Materiales y Métodos	39
Microorganismos	39
Cultivo celular primario de glándula mamaria	39
Ensayos de adherencia	40

Ensayos de daño celular	42
Resultados	45
Cuadro 3.1	47
Figura 3.1	48
Figura 3.2	48
Figura 3.3	49
Figura 3.4	49
Figura 3.5	50
Figura 3.6	50
Figura 3.7	51
Discusión	52
- Literatura citada	58
- Apéndice	61

IV

RESUMEN

PATOGENICIDAD DE MICOPLASMAS INVOLUCRADOS EN LA MASTITIS BOVINA

MVZ. Rosa Elena Miranda Morales

Tutor : Dr. Francisco Trigo Tavera

Asesor : Dr. Francisco Suárez Guemes

De 50 muestras de leche de bovinos con problemas de mastitis recurrentes, de Tizayuca, Hidalgo, México., se obtuvieron 18 aislados de *Mycoplasma spp*, se procesaron en el medio de cultivo de Hayflick a la temperatura de 37 C, en una atmósfera de 5-10% CO₂ por 72 hrs. Las 18 cepas de *Mycoplasma spp* carecen de pared celular, fermentan la glucosa, producen películas y manchas, reducen el tetrazolio en aerobiosis, son fosfatasa activa y tienen actividad proteolítica al hidrolizar la caseína. Las 18 cepas son consideradas el mismo serotipo al identificarlas con un antisuero policlonal, preparado de una de las cepas seleccionadas aleatoriamente, en las pruebas de Inhibición del crecimiento e Inhibición del metabolismo. En las colonias de los aislados se utilizaron diferentes antisueros de micoplasmas con la prueba de inmunofluorescencia indirecta, las cepas no coincidieron con ningún antisuero de las especies de micoplasmas responsables de producir mastitis y de micoplasmas proteolíticos, lo que sugiere que es una nueva especie de micoplasma que se le asignó el nombre de *Mycoplasma mexicanensis*. *Mycoplasma mexicanensis* hemoadsorbe eritrocitos de cuye y de bovino, citoadsorbe células epiteliales de glándula mamaria, pruebas importantes para establecer que estos microorganismos, en su fase log, se adhieren a las células epiteliales de un cultivo primario de glándula mamaria a los 30

✓

minutos de infección, estudio que se realizó junto con cepas control de *M. bovis*, y *M. canadense* responsables de producir mastitis, y no se encontró diferencia significativa en la adherencia entre las cepas. Se observó que las células presentaron alteración en su morfología, de poligonales a redondeadas en la microscopía de barrido; y en la microscopía de transmisión se observó que los micoplasmas están unidas a la membrana de la célula huésped por medio de proyecciones de su membrana formando un puente de unión, situación que se observa en algunas especies de micoplasmas. *M. mexicanensis*, cepa en estudio, tiene la capacidad de producir daño; evento que se corroboró con la microscopía de barrido a partir de los 30 minutos de infección y por la presencia de la enzima deshidrogenasa láctica a partir de las dos horas. Es así, que con los resultados obtenidos se puede sugerir que *Mycoplasma mexicanensis* tiene la capacidad de adherirse y producir daño a las células epiteliales de glándula mamaria *in vitro* y se puede hipotetizar como un patógeno involucrado en problemas de mastitis de los bovinos.

INTRODUCCIÓN

Antecedentes históricos.

El primer informe de micoplasma cultivado de un caso de pleuropneumonía bovina fue en 1898 por Nocard y Roux a partir del aislamiento de *Mycoplasma mycoides* subsp *mycoides*. Los micoplasmas ocasionan diferentes problemas en bovinos, los respiratorios por *M. mycoides* subsp *mycoides*, *M. bovis*, *M. dispar*, los problemas de mastitis por *M. bovis*, *M. californicum*, *M. canadense*; y los reproductivos por *M. bovigenitalium*, *Ureaplasma diversum*. No fue hasta 1947 que se realizó por Edward y Freundt, el primer informe de mastitis por *Mycoplasma bovigenitalium* en Inglaterra, aislado del aparato genital y semen, que ocasiona vulvovaginitis, infertilidad y mastitis (Stuart *et al* 1963, Cho 1976, Jasper 1977). Posteriormente en 1962 se presentaron fuertes brotes de mastitis en Connecticut, New York, y California causados por *Mycoplasma agalactiae* subsp *bovis* también llamado *M. bovimastitidis*, ahora conocido como *M. bovis* (Hale, *et al* 1962). Una nueva especie, *M. californicum*, es la segunda especie que con mayor frecuencia se encuentra involucrada en mastitis ocasionando severa inflamación, afectando la funcionalidad de la glándula mamaria; este cuadro se ha observado en California, Irlanda, Escocia y Alemania. *M. canadense* fue descrita por primera vez en Canadá (Runhke y Onoviran 1975) y se consideró como una especie nueva, esta especie es un patógeno importante de mastitis en California.

Los micoplasmas menos comunes que producen mastitis son *M. bovigenitalium* y *M. alkalescens*; se han logrado aislar otros micoplasmas de glándula mamaria como *M. bovirhinis*, *M. arginini* y *Acholeplasma laidlawii*, aunque se cuestiona su patogenicidad y son considerados como microorganismos contaminantes. La especie de micoplasma *M. capricolum*, que afecta a los caprinos y es considerado patógeno importante de ovinos, se le ha asociado también con la mastitis clínica

en bovinos. Los micoplasmas *M. bovis*, *M. bovis genitalium*, pueden estar presentes en el aparato respiratorio ó genital de bovinos aparentemente sanos, y sirven como posible fuente de infección para la glándula mamaria.

Generalidades de los micoplasmas.

Los micoplasmas se dividen en organismos helicoidales y no helicoidales, los helicoidales lo forman los *Spiroplasmas* que son habitantes de plantas y artrópodos y muchos de ellos son considerados patógenos. Los micoplasmas no helicoidales que no requieren de esteroides son los *Acholeplasmas*, estos microorganismos son comensales y no se consideran patógenos de los animales en condiciones normales. Los organismos no helicoidales dependiente de esteroides son los micoplasmas (ureasa negativos) y ureaplasmas (ureasa positivos). Aproximadamente 95 especies de micoplasmas y ureaplasmas son patógenos en los animales y el hombre. Los micoplasmas son huéspedes dependientes, parásitos extracelulares, sin embargo cepas como *M. fermentans* y *M. penetrans* son intracelulares potencialmente patógenos en personas infectadas de SIDA (Síndrome de inmunodeficiencia adquirida). La micoplasmosis en los animales domésticos es considerada una enfermedad multifactorial, donde los factores predisponentes como infecciones recurrentes, hacinamiento, condiciones climáticas desfavorables, edad, constitución genética, estrés y manejo, juegan un papel importante. La enfermedad por micoplasmas se pueden categorizar como I) enfermedad septicémica, II) diseminación por sangre seguida por inflamación de cavidades y articulaciones III) enfermedad local del aparato respiratorio, genital, glándula mamaria y conjuntiva (Gyles, Thoen 1993).

Los micoplasmas son microorganismos procariotes de la clase Mollicutes. El termino fue introducido por Nowak (1929), y se atribuye a la ausencia de la pared celular y a la inhabilidad para sintetizar el peptidoglicano. Son microscópicamente visibles y extremadamente pleomórficos, de tal manera que las células varían de

forma cocoide, cocobacilar, anillada, ramificada, filamentosa y agrupadas en forma de rosario con diámetro de 200 a 400 nm. La ausencia de la pared celular se refleja en la plasticidad del organismo.

Estructuralmente la membrana de los micoplasmas es trilaminar de 7.5 a 10 nm; la capa media es menos electrodensa que las otras dos, contiene esteroides y carece de ácido diaminopimérico (McElhaney 1992). Es una membrana con una bicapa de lípidos, las proteínas de membrana son importantes ya que contribuyen en la estructura y en la actividad inmunológica de la célula. El citoplasma de los micoplasma generalmente es uniforme, sin embargo algunas especies presentan estructuras terminales de adhesión y otras especies presentan esas estructuras con una zona densa central como finos gránulos, su función y organización se desconoce.

La reproducción de los micoplasmas es por fisión binaria, se observan numerosas formas morfológicas de micoplasmas debido a la división citoplasmática que no siempre está sincronizado con la replicación del genoma. Carece de estructuras membranales, algunas cepas poseen estructuras externas como la cápsula. Son las formas viables más pequeñas ya que pasan a través de membranas filtrables de poros con diámetro entre 450 y 200 nm. No poseen flagelos o pili, las especies que son móviles presentan movimiento de traslación. Se consideran Gram negativos pero se tiñen mejor con la tinción de Giemsa.

El genoma de los *Mycoplasmatales* es aproximadamente 800 a 1200 pares de kb, corresponden a 600-800 genes, que se considera lo mínimo necesario para tener vida independiente. El ADN es pobre en guanina y citosina (18-40%). No es difícil aislar y clonar genes de micoplasmas dentro de cepas de *Escherichia coli*, sin embargo es difícil que los genes de micoplasma se expresen en este hospedador. Esto es debido a la diferencia del codón utilizado ya que muchos micoplasmas leen al triptofano como UGA, mientras que *E. coli* lo lee como un codón de término en la síntesis de proteínas. El análisis de la secuencia de los genes de la subunidad 16S del ARNr ha mostrado una fuerte relación con el género de *Clostridium* y

sugieren que el micoplasma constituye una forma evolutiva degenerada (Weisburg *et al.* 1989, Bové 1993, Dybvig *et al.* 1996). Son mucho más sensibles que las bacterias poseedoras de pared celular a condiciones ambientales, tales como la osmolaridad del medio y su membrana es muy sensible al daño producido por sustancias tensioactivas. Los micoplasmas son frágiles fuera del hospedador; el microorganismo es susceptible al calor, detergentes, desinfectantes y sustancias antimicrobianas que inhiben la transcripción, traducción y a la enzima ADN girasa. Hay antimicrobianos útiles que actúan primariamente en la síntesis de la pared celular o en la integridad de la pared celular (Whitford 1994).

Por su limitado potencial genético los micoplasmas requieren una íntima asociación con la célula huésped y es así que para su crecimiento *in vitro* requieren de medios enriquecidos los cuales deben contener adecuados niveles de proteína, esteroides y ácidos grasos, esto debido a la ausencia de la pared celular. Los micoplasmas en términos generales son microorganismos fastidiosos en sus requerimientos nutricionales, quizás debido al pequeño tamaño de su genoma, presentan una limitada capacidad biosintética, lo que los hace dependientes de una gran variedad de moléculas precursoras para sintetizar compuestos macromoleculares como proteínas, lípidos membranales y ácidos nucleicos.

Muchos de los medios preparados para el crecimiento de micoplasmas se basan en el medio Edward el cual contiene peptonas, infusión de corazón de bovino, precursores de ácidos nucleicos, autolisado de levadura junto con el extracto de levadura que proveen factores de crecimiento lábiles al calor, así como suero el cual provee lípidos no tóxicos y protección al unirse con iones metálicos tóxicos y cloruro de sodio u otro soluto no iónico para ajustar la osmolaridad del medio. Los micoplasmas son cultivados en medios enriquecidos que le proveen carbohidratos y aminoácidos para el metabolismo energético, síntesis de proteínas y lípidos; para la síntesis de membrana, requieren de esteroides que incorporan dentro de la membrana, creando un ambiente osmótico estable para sobrevivir en condiciones fisiológicas normales. El crecimiento es lento variando entre 1 y 10 horas y en

ocasiones hasta días cuando se realiza el primer aislamiento. Son capaces de crecer en un ambiente aerobio o anaerobio facultativo. Muchas especies en el medio sólido desarrollan pequeñas colonias en forma de huevo frito que muestran un crecimiento central en el medio de cultivo.

La identificación de los micoplasmas, aislados en el medio de cultivo adecuado, se basan por su reactividad bioquímica y antigenicidad. Algunas especies de micoplasmas pueden utilizar la glucosa y otros carbohidratos como manosa, maltosa como fuentes energéticas; y otros micoplasmas utilizan aminoácidos como la arginina, de tal manera que de los micoplasmas clasificados taxonómicamente, 45 fermentan la lactosa, 38 hidrolizan la arginina, 9 usan ambos substratos y 8 carecen de las dos rutas : glucosa y arginina.

La técnica de inmunofluorescencia empleando sueros específicos es de utilidad en la identificación de especies de micoplasmas, así como las pruebas de inhibición del crecimiento, ELISA y técnicas moleculares (Razin y Freundt 1984, Whitford 1994). El aislamiento satisfactorio a partir de muestras clínicas depende de varios factores, incluyendo aquellos factores del hospedador que pueden condicionar su aislamiento, así como factores de cultivo y técnicas que pueden favorecer o limitar el aislamiento primario de estos microorganismos (Cuadro 1.1).

Las estructuras superficiales que presentan los micoplasmas, cápsula, proyecciones superficiales, y fibrilinas son descritas en varias especies de micoplasmas patógenos de animales y humanos, estas estructuras amorfas extendidas sobre 20 a 30 nm fuera de la membrana fueron sugeridas como responsables de la hemoaglutinación, adherencia, y en la virulencia en general. El actual conocimiento de la virulencia como de la composición química de estas estructuras es muy incierta (Ajufo y Whithear 1978). La cápsula se ha observado en *M. pneumoniae*, *M. hyopneumoniae*, *M. synoviae*, *M. gallisepticum* (Ajufo y Whithear, 1978, Tajima y Yagihashi 1982, Tajima *et al* 1982, Almeida *et al* 1991). El galactano es un material extramembranal, identificado como un carbohidrato sobre la superficie del micoplasma, aislado de *M. mycoides subsp mycoides* (Plackett *et al*

1958). Los productos metabólicos tóxicos que liberan los micoplasmas como el peróxido de hidrógeno, se han detectado en *M. pneumoniae*, *M. gallisepticum*, *M. pulmonis*, *M. neurolyticum subsp capri*, y producen daño a eritrocitos y a células epiteliales (Whittlestone 1972, Razin 1978). Algunos micoplasmas producen arginina deaminasa y por lo tanto utilizan la arginina que se encuentra alrededor de la célula huésped provocando la carencia de este aminoácido esencial ocasionando que el crecimiento celular esté comprometido (Whittlestone 1972). El producto final de el metabolismo de la arginina y la hidrólisis de la urea es el amoniaco, que es bien conocido su efecto tóxico en las células (Razin 1978). Varias especies de micoplasmas producen exotoxinas, su efecto tóxico se ha observado por la inoculación experimental en el huésped natural. *M. gallisepticum* produce polliarteritis nodosa con necrosis e inflamación (Thomas 1970). Con *M. mycoides subsp mycoides* la inoculación de la toxina por vía subcutánea produce necrosis pulmonar en bovinos. *M. bovis* induce una respuesta inflamatoria eosinofílica cuando se inocula en forma intramamaria (Boughton 1976).

Mastitis por micoplasmas.

Mycoplasma bovis es el micoplasma más invasivo que produce neumonías y mastitis en bovinos y se encuentra distribuido en todo el mundo. *M. canadense* y *M. californicum* se han reportado como causa de mastitis en California (EEUU) y en otros países (Jasper 1994). En las mastitis producidas por micoplasmas se observa inflamación de la glándula con baja súbita de la producción láctea, la infección puede involucrar a más de una o a las cuatro glándulas, en la leche se observa un sedimento con depósitos de aspecto arenoso y exudado purulento que se puede observar en las primeras semanas y posiblemente continúa en la siguiente lactación. En hatos en que la micoplasmosis es endémica la inflamación puede ser menos intensa, la morbilidad y la recuperación de los animales es variable. La mastitis por micoplasmas es propagada frecuentemente en el periodo de descanso lactacional con mal tratamiento (Jasper 1979). El diagnóstico es por

medio del aislamiento e identificación del microorganismo o bien realizando la prueba de ELISA con anticuerpos monoclonales para *M. bovis* (Heller *et al.* 1993).

Algunos investigadores han sugerido el tratamiento con tetraciclinas, gentamicina, pero se conoce que es muy difícil erradicar el problema de las vacas ya que se observan problemas de mastitis reincidentes. Los micoplasmas sobreviven en la piel del pezón de la glándula mamaria y en el medio ambiente y únicamente 1 a 2 días sobre madera y metal pero varias semanas en paja, esponjas y agua de bebida. Los bovinos que toman leche infectada con micoplasmas pueden presentar problemas del aparato respiratorio; estas infecciones pueden contribuir posteriormente a problemas neumónicos. Es muy probable que las vacas tratadas por una mastitis bacteriana puedan desarrollar inmediatamente después una mastitis por micoplasmas debido a un descuidado procedimiento en el tratamiento; así se ha observado que hatos tratados contra infecciones por *Streptococcus agalactiae* están predispuestos a infecciones por micoplasmas. Se debe tener una práctica especial en la introducción de animales nuevos sobre todo de aquellos que presentan problemas de mastitis, estos animales deben estar siempre en observación (Whitford 1994).

La mayoría de los micoplasmas son huésped - específico, algunas especies producen enfermedades severas, otras están asociadas con enfermedades y muchos parecen ser no patógenas. La patogenicidad de algunas especies de micoplasmas es hasta ahora incierta. El aislamiento de micoplasmas en animales y hombre sanos no es una prueba para considerarlo un comensal. Si el aislamiento ocurre en tejidos enfermos y si se encuentran otros microorganismos involucrados, esto no es una prueba de que sea un patógeno. Los micoplasmas de importancia veterinaria están sujetos fácilmente a exámenes de inoculación del huésped natural, sin embargo por el bajo grado de patogenicidad es muy difícil de demostrar, si su expresión depende de una interacción sinérgica entre varios microorganismos o por factores de estrés. La habilidad para producir enfermedad

es el resultado de la interacción entre los componentes superficiales de la membrana de un patógeno y de la célula huésped infectada.

Los micoplasmas inician la infección adhiriéndose a los tejidos seguido de daño celular. Estos microorganismos son tan pequeños que se observan adheridos en zonas aparentemente inaccesibles para protegerse de los mecanismos de defensa del huésped (Bredt 1976). La adherencia de los micoplasmas a la membrana pueden ocasionar problemas a la célula huésped, ya que la respuesta inmune debe tener una alta proximidad a la membrana celular infectada con la posibilidad de combatir la interacción y por ello puede causar daño al tejido del hospedador (Bredt 1976), los micoplasmas al estar unidos a determinantes como el ácido siálico pueden inhibir la función fisiológica normal de esos receptores resultando en una disfunción celular (Lloyd 1975).

La adherencia permite que los micoplasmas liberen sustancias como hemolisinas, enzimas proteolíticas, nucleasas y metabolitos tóxicos directamente a la célula infectada alterando la integridad de la membrana, lo cual ocasiona que la célula huésped libere sus componentes esenciales o exista interferencia con funciones vitales. Muchos micoplasmas no son muy invasivos, y se encuentran confinados a superficies epiteliales provocando una leve infección localizada sin llegar a penetrar a los tejidos o diseminarse a otros órganos. Muchos patógenos del aparato respiratorio pueden persistir por meses en el sitio de infección después de que se eliminó la enfermedad clínica, sin causar daño al paciente. Por ejemplo, *M. neurolyticum* es un patógeno potencial de roedores, se puede recuperar de ratones aparentemente sanos, en los cuales la infección se desarrolla cuando hay estrés físico o biológico. Los micoplasmas pueden sobrevivir y persistir por largos periodos en su huésped porque no inducen una respuesta inmunológica intensa en ellos. Se sugiere que es necesaria la exposición repetida para producir una enfermedad severa por micoplasmas. Los micoplasmas usualmente producen enfermedades localizadas en las superficies mucosas, ya que la forma sistémica no se involucra y la respuesta humoral es baja (Le Grand *et al* 1996). Durante la

enfermedad se ha observado que los componentes celulares del huésped pueden adsorberse a la superficie de los micoplasmas, este evento las protege de las defensas del huésped y favorece el desarrollo de autoanticuerpos durante la enfermedad. La adsorción de componentes proteicos ocurre también durante el cultivo y crecimiento de los micoplasmas con los componentes del medio de cultivo (Kion *et al* 1991).

Varios estudios *in vitro* se han desarrollado para determinar la interacción de los micoplasmas con la célula huésped, en los cuales se utilizan cultivos celulares de tejidos y órganos. Se han realizado estudios para conocer por qué la infección por micoplasmas ocurre en el epitelio, se utilizan cultivos celulares de tráquea para analizar el curso de una infección localizada en mucosas y el daño celular resultante, la habilidad de los micoplasmas para unirse a receptores de la mucosa, la naturaleza química del sitio de unión del micoplasma y el receptor de la célula del tejido, la relativa virulencia de la cepa de micoplasmas, la función e importancia de los factores de virulencia como las hemolisinas para producir daño en los epitelios ciliados o no y el efecto de los micoplasmas sobre el metabolismo y función de las células epiteliales infectadas. Sin embargo cuando los modelos *in vitro* proveen de mucha información sobre el curso de una infección localizada, se debe recurrir a un modelo animal *in vivo* controlado para obtener el conocimiento de la respuesta humoral y celular del huésped en una enfermedad infecciosa (Kahane 1984).

CUADRO 1.1

**ALGUNOS FACTORES QUE PUEDEN INTERFERIR CON EL AISLAMIENTO DE
MICOPLASMAS.**

FACTORES DEL HUESPED	FACTORES DEL CULTIVO
Presencia de antibióticos u otras sustancias en tejidos o fluidos	Pobre calidad de los medios de cultivo debido a la variabilidad de los lotes.
Presencia de enzimas u otros inhibidores en tejidos	Deficiente elección del medio de cultivo suplementos, pH, condiciones atmosféricas y temperatura.
Bajos niveles de organismos en los tejidos seleccionados.	Actividad inhibitoria del acetato de talio, o antibióticos del medio.
Anticuerpos en los tejidos o fluidos del huésped.	Mycoplasmas sensibles a los componentes del medio de cultivo, como extracto de levadura, agar, o suero (más frecuentemente observado con aislamientos frescos).
	Competencia con la microflora, incluyendo otros micoplasmas.
	Mycoplasmas latentes que están presentes en los cultivos empleados (huésped, animal, cultivo celular, suero, embriones de pollo, etc) para el aislamiento primario.

LITERATURA CITADA

1. Ajufo JC y Whitear KG. Evidence for a ruthenium red staining extracellular layer as the haemagglutinin of the wv 1853 strain *Mycoplasma synoviae*. Aust. Vet J. 1978 ; 52 :502-504.
2. Almeida RA y Rosenbush RF. Capsule-like surface material of *Mycoplasma dispar* induced in vitro grown in culture with bovine cells is antigenically related to similar structures expressed in vivo. Infect Immun. 1991; 59: 3119-3125.
3. Barile MF, Grabowski MV. 1973. Detection and identification of mycoplasmas in infected cell cultures by direct immunofluorescence staining. In: Methods in Mycoplasmaology. vol 2. Ed Tully SG, Razin S. 181 pp. Academic Press, New York.
4. Boughton E. *Mycoplasma bovis* mastitis. Vet Bull. 1976 : 377-387.
5. Bové JM. Molecular features of mollicutes. Clin. Infect. Dis. 1993 ; 17 (1) : 10-31.
6. Bredt W, Feldener J, Kahane I. Adherence of mycoplasmas to cells and inert surfaces : phenomena, experimental models and possible mechanisms. Isr. J. Med. Sci. 1981 ; 17 : 586-588.
7. Cho T. *Mycoplasma mastitidis* outbreak . Vet. Rec. 1976; 118 : 647.
8. Dybvig K y Voelker LL. Molecular biology of mycoplasmas. Annu. Rev. Microbiol. 1996 ; 50 : 25-57.
9. Gyles CL, Thoen CO. 1994. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 2a- ed. Iowa State University Press. Ames. USA. 297-311
10. Hale HH, Helmboldt CF, Plastringe WN, Stula EF. Bovine mastitis caused by a mycoplasma species. Cornell Vet. 1962; 52 : 582-591.
11. Heller M, Berthold E. Antigen capture ELISA using monoclonal antibody for the detection of *Mycoplasma bovis* in milk. Vet. Microbiol. 1993; 37:127-33.

12. Jasper DE. Bovine mycoplasmal mastitis. *J. Am Vet Med Assoc.* 1979; 175:1072-4.
13. Jasper DE, 1994. Mycoplasma and bovine mastitis, In *Mycoplasmosis animals : Laboratory diagnosis* , eds, Whitford HW, Rosenbush RF. Laverman L. Iowa state University Press Ames , Iowa. 62-7.
14. Jasper DE. Pathogenesis of bovine mycoplasma mastitidis. *J. Am. Vet. Met. Assoc.* 1977 ; 170 : 1167-1172.
15. Kahane I. *In vitro* studies on the mechanism of adherence and pathogenicity of Mycoplasmas. *Isr. J. Med. Sci.* 1984 ; 20 : 874-877.
16. Kion TA y Hoffmann GW. Anti HIV and anti-anti MHC antibodies in alloimmune and autoimmune Mice. *Sciences.* 1991 ;253 :1138-1140.
17. Le Grand D, Solsona M, Rosengarten R, Poumarat F. Adaptative surface antigen variation in *Mycoplasma bovis* to the host immune response. *FEMS Microbiol Lett.* 1996 ;144 (2-3) :267-275.
18. Lloyd LC, Pierce DWT y Bingley JB. Changes in fibrinogen levels, platelet counts, clotting times and fibrinolytic activity in relation to thrombosis in contagious bovine pleuropneumoniae. *J. Comp Path .* 1975 ; 85 : 583-595.
19. McElhaney RN. 1992. Membrane structure Mycoplasmas : Molecular biology and pathogenesis. eds Maniloff J, Elhaney RN. American Society for Microbiology, Washington DC. 113-55.
20. Nowak J. Morphologie, nature et cycle évolutif du microbe de la pri pneumonia. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 1929 ; 12 : 240-62.
21. Plackett P y Buttery SH. A galactan from *Mycoplasma mycoides* . *Nature.* 1958 ; 207 : 43-45.
22. Razin S. The Mycoplasmas *Microbiol Rev.* 1978 ; 42 : 414-470.
23. Razin, S. and Freundt, E.a. 1984. Division Tenericutes. Div. Nov. (G.v. p. 36) class I. Mollicutes In: De. N.R., Kriey and J.G. Holt. *Bergey''s Manual of Symatic Bacteriology.* Vol. 1 *Williams and Wilkins.* Baltimore.
24. Ruhnke HL, Onoviran O : *Mycoplasma canadense*, a new bovine species. *Int. J. System Bact.* 1975 ; 26 : 212-219.

25. Stuart P, Davidson I, Slavin G. Bovine mastitidis caused by mycoplasma. *Vet. Rec.* 1963; 75 : 59-64.
26. Tajima M, Yagihashi T. Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* with the porcine respiratory epithelium as observed by electron microscopy. *Infect Immun.* 1982 ; 37 :1162-1169.
27. Tajima M, Yagihashi T y Miki Y. Capsular material of *Mycoplasma gallisepticum* and its possible relevance to the pathogenic process. *Infect Immun.* 1982 ; 36 :830-833.
28. Thomas L, Davidson M y McCluskey. Studies of PPLO infection. IV. Neurotoxicity of intact mycoplasmas, and their production of toxin in vivo and in vitro. *J. Exp. Med.* 1970 ; 124 :1089-1098.
29. Weisburg WG, Tully JG, Rose DL, Petzel JP, Oyaizu H, Yang D, Mandelco L, Sechrest J, Lawrence, TG, Van Etten J, Manilof J and Woese CR,. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas : Basis for their Classification . *J. Bacteriol.* 1989 ; 171 : 6455-6467.
30. Whittlestone P. Microbial pathogenicity in man and animals. *Symp. Soc. Gen. Micro.* 1972 ; 22 : 217-250.
31. Whittford HW, RosenbuschRF, Luerman LH. *Mycoplasmosis in animals : Laboratory diagnosis.* Iowa State University Press Ames. USA. 1994. 1-173.

AISLAMIENTO Y TIPIFICACION DE MICOPLASMAS A PARTIR DE MUESTRAS DE LECHE DE BOVINOS CON MASTITIS

INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina causada por micoplasmas es producida principalmente por *Mycoplasma bovis*, ésta se encuentra difundida fundamentalmente en Norteamérica, Europa y Asia (Hale *et al* 1962, Boughton 1979, Jasper 1981, Jasper 1994). Otras especies de micoplasmas igualmente importantes como causa de mastitis son *M canadense* (Langford *et al* 1976), así como la nueva especie *M. californicum* considerada en los E.E.U.U. la segunda especie responsable de producir mastitis (Jasper 1979). Algunas otras especies son productoras de mastitis, aunque con menos frecuencia : *M. bovigenitalium*, *M. alkalescens*, *M. bovirhinis*, *M. arginini*, y *Acholeplasma laidlawii* (Jasper 1981).

La mastitis por micoplasmas se caracteriza generalmente por una súbita baja en la producción láctea, pueden estar involucrados varios o todos los cuartos de la glándula. La secreción presenta grumos y se llega a formar un sedimento; en algunos casos se puede presentar exudado purulento. El problema puede continuar por semanas y en ocasiones prolongarse en la siguiente lactación. Las secreciones pueden contener un alto número de microorganismos que permiten alta difusión y severas infecciones. En bovinos con micoplasmosis persistente, la inflamación es menos severa, la morbilidad y la recuperación de los animales es variable. El uso de la quimioterapia no es del todo efectiva.

En México hay pocos informes del aislamiento de micoplasmas a partir de bovinos con mastitis (Avila *et al* 1983, Hernández *et al* 1984). Se ha observado que

en vacas con problemas de mastitis reincidentes no se aíslan las bacterias más comúnmente involucradas en procesos de mastitis; y si éstas se llegan a aislar, se encuentran en cantidad escasa. Esto es indicativo de que posiblemente los micoplasmas están involucrados y no se logra un diagnóstico etiológico por la dificultad que representa el aislamiento del microorganismo. Se desarrolló el presente estudio con el fin de conocer las especies de micoplasmas involucradas en la producción de mastitis en bovinos de México a partir de procesos reincidentes de la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Con el fin de aislar micoplasmas se colectaron 50 muestras de leche, como lo indica el Consejo Nacional de Mastitis (National Mastitis Council, 1987), a partir de vacas con problemas de mastitis reincidente, en hatos lecheros de la cuenca lechera de Tizayuca, Hidalgo, México. Las condiciones de inclusión para este estudio fueron que las vacas con problemas de mastitis no presentaban mejoría al tratamiento con quimioterapéuticos comunes y la secreción láctea de esos animales debía observarse con el suero separado. Después de obtenidas las muestras se enviaron en refrigeración a 4 C al laboratorio para su inmediato procesamiento. El medio de cultivo que se utilizó para el aislamiento de micoplasma fue el medio de cultivo Hayflick (Jasper 1981) (Apéndice 1). Combinados todos los ingredientes, el medio líquido fue envasado en alícuotas de 2 ml y se conservaron en congelación a -20 C hasta su uso. Las cajas de agar (medio sólido), se prepararon con Ion Agar No 2¹ que es un agar puro y no es tóxico para los micoplasmas, el medio sólido llevó una concentración de agar de 0.8 % en agua deionizada y se esterilizó a 15 libras, a 121 C por 15 minutos (Freund 1983). Se probó una cepa de micoplasma de *M. bovis*², adaptada *in vitro* para comprobar la confiabilidad del medio de cultivo.

TÉCNICA DE CULTIVO. Las secreciones lácteas se incubaron 37 C por 2 horas para disolver las moléculas de grasa, posteriormente se tomaron 200 µl de leche y se sembraron en el medio líquido. Se realizaron diluciones de base 10, hasta la dilución 10⁻⁴, con la finalidad de diluir posibles microorganismos contaminantes y

1. Ion agar No. 2. Merck Labs.

2. *M. Bovis*, cepa Donnetta , PG 45. Donada por la Universidad de Aahrus, Dinamarca.

agentes inhibidores que pudieran estar presentes en las muestras e inhibir el crecimiento de los micoplasmas presentes. En el medio sólido se depositaron 60 μ l de secreción y se distribuyeron por medio de estrías en aislamiento en cultivo puro (Barber 1976, Jasper 1979). Después de la siembra se incubaron las cajas de medio sólido en microaerobiosis bajo una atmósfera de 5 -10 % CO_2 y los tubos con las diferentes diluciones se incubaron en aerobiosis a la temperatura de 37 C, durante un periodo de 24 a 72 horas. Los tubos con las diluciones se observaron cada 24 horas para detectar cambios de pH, que sugirieron el crecimiento de micoplasmas. Los tubos que presentaron cambios de pH se subcultivaron en el medio sólido y se incubaron en microaerobiosis a 37 C de 24 a 72 horas, posteriormente se buscaron colonias típicas de micoplasmas en las cajas de medio sólido del primo cultivo con la ayuda del microscopio estereoscopio. A las diluciones se les realizaron pases ciegos en medios líquido y sólido, usando un medio de cultivo fresco cada ocho días, esta metodología se repitió hasta cumplir 30 días para diagnosticar que la muestra fue negativa a micoplasmas (Whitford 1994).

SUBCULTIVOS. Los aislados que presentaron morfología de colonia típica de micoplasmas (huevo frito), se purificaron por el proceso de clonación triple (Boatman 1979), y se conservaron en crioprotectores en nitrógeno líquido para posteriormente realizar las pruebas básicas de identificación. Para la clonación el aislamiento se cultivó en medio sólido y se incubó a 37 C con 5-10 % CO_2 por 24 - 48 h , se tomaron del agar con ayuda de una pipeta Pasteur tres colonias perfectamente aisladas y se depositaron cada una de ellas en medio líquido triturando el agar para liberar la colonia. Los tres tubos se incubaron en aerobiosis a 37 C hasta que se observó un cambio de pH. Posteriormente uno de los tubos se sembró nuevamente en medio sólido y se incubó en una atmósfera de

5 - 10 de CO₂ a 37 C de 24 a 72 h. Este proceso se repitió por tres ocasiones. A las cepas aisladas se les realizó la identificación básica para micoplasmas.

IDENTIFICACIÓN BÁSICA PARA MICOPLASMAS. Pruebas que se realizaron para establecer el género de *Mycoplasma spp.*

Filtrabilidad. La prueba de filtrabilidad se realizó a partir de un cultivo de micoplasma de 24 horas en medio líquido, para ello se utilizaron filtros con poros 0.45 µm¹ estériles (Tully 1983), los cuales antes de utilizarse se lavaron con una solución amortiguadora de fosfato pH 7.0 estéril con el fin de eliminar cualquier sustancia inhibitoria, posteriormente se filtró la suspensión de micoplasma. El filtrado se recolectó en un tubo estéril y posteriormente se sembró en el medio de Hayflick en líquido y sólido; los tubos de medio líquido se incubaron a 37 C en aerobiosis el medio líquido, mientras que las cajas de medio sólido se incubaron en una atmósfera con 5 a 10% de CO₂ por 24 a 48 hrs, posteriormente las cajas se observaron con la ayuda de un microscopio estereoscopio para localizar colonias.

No reversión a formas L bacterianas. El filtrado igualmente se sembró en el medio sólido de Hayflick sin antibiótico y sin acetato de talio, por estría continua y se incubó a 37 C durante 48 hrs en una atmósfera con 5 a 10% de CO₂ (Martín 1980), posteriormente se examinaron las muestras.

Dependencia de esteroides. Se utilizó la prueba indirecta de la digitonina, con discos de papel filtro que se impregnaron con el reactivo de la digitonina y se dejaron secar antes de su uso (Razin 1970, Tully 1983). Del cultivo filtrado se

1. Millipore Filter Corpo. Bedford, Mass. USA.

sembró una gota en medio sólido permitiendo que escurriera sobre la superficie. Una vez seca, se sembró sobre la zona inoculada un disco impregnado con el reactivo, la caja fue incubada con 10% de CO₂ a 37 C por 48 horas.

Ausencia de pared celular. Se procesó para microscopía electrónica de transmisión una de las cepas aisladas, seleccionada aleatoriamente, para demostrar la ausencia de pared celular (Boatman 1979). Se utilizaron dos metodologías a partir de medio sólido y líquido:

primer procedimiento: Se realizaron cortes de agar en donde se localizaron claramente las colonias.

segundo procedimiento: Las células libres se centrifugaron a 8,000 g, por 30 minutos para obtener un concentrado de micoplasmas, posteriormente a cada paso del procedimiento se centrifugaron las células a 8,000 g, 5 minutos. Las muestras se lavaron con PBS pH 7.4, se fijaron con glutaraldehído al 2.5% a temperatura ambiente por 60 minutos. Se lavaron las muestras con PBS pH 7.4 por 15 minutos y se fijó en tetraóxido de osmio por 60 minutos a temperatura ambiente, se deshidrataron realizando lavados con etanol en concentración ascendente, cada lavado fue de 15 minutos para cada concentración. Las muestras fueron incluidas en resina Epon, cortadas y teñidas con citrato y acetato de uranilo y fueron observadas en el microscopio electrónico de transmisión¹

IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE LOS AISLADOS DE MICOPLASMAS.

Las pruebas bioquímicas que se utilizaron para la identificación de todas las especies de micoplasmas aisladas (Blackburn 1976) fueron :

1. Microscopio electrónico de transmisión

Fermentación de la glucosa. La prueba se basa en la capacidad metabólica que presentan los micoplasmas para utilizar la glucosa produciendo metabolitos ácidos, al observar un decremento de pH del medio de cultivo de crecimiento adecuado para la fermentación de la glucosa. Ésta se realizó con la inoculación de micoplasmas en un tubo con medio de cultivo y sustrato, y como control, un tubo sin inocular. Se incubaron a 37 C durante 24 a 72 hrs. Un cambio de pH de 0.5 ó mas, del tubo inoculado comparado con el control se consideró positivo (Edward y Moore 1975).

Fosfatasa alcalina. La fosfatasa es una enzima que producen y liberan algunas especies de micoplasmas y puede detectarse sobre el sustrato fosfato fenolftaleína, la enzima hidroliza el fosfato de fenolftaleína produciendo fosfato y fenolftaleína libre. El fosfato de fenolftaleína es incolora y la fenolftaleína libre es roja en rangos de pH de 9 a 10. La hidrólisis es determinada en medio sólido el cual es inoculado por triplicado y se incuba a 37 C durante 24 a 72 hrs, posteriormente al desarrollo de micoplasmas se agregó NaOH 5N sobre las colonias. Una reacción positiva ocurre cuando se observa una coloración roja en el medio, comparado con un control que es medio sólido sin inocular el cual se observa sin cambio de coloración (Whitford 1994).

Reducción del tetrazolio. La actividad de las deshidrogenasas durante el metabolismo de algunas especies de micoplasma, se detecta cuando al medio de cultivo se le agrega el reactivo tetrazolio ya que actúa como aceptor de electrones, el cual es reducido produciéndose una coloración roja con la presencia de micoplasmas. El cultivo de micoplasmas se siembra en cultivo puro en el medio sólido y se incuba a 37 C durante 48 a 72 hrs (Freund 1958).

Películas y manchas (Film and spot). La película que se observa en la superficie del cultivo en medio sólido con colonias desarrolladas está formada de colesterol y fosfolípidos. Las manchas alrededor de las colonias son debidas a los depósitos de sales de calcio y magnesio de los ácidos grasos liberados por la actividad lipolítica de los micoplasmas. El medio sólido se inoculó con el cultivo de micoplasma y se incubó a 37 C durante 24 a 72 hrs (Freundt 1983).

Hidrólisis de la caseína. Prueba que permite conocer la actividad proteolítica de los micoplasmas, útil para la caracterización de algunas especies de micoplasmas. Al medio de cultivo de Hayflick se le agregó leche descremada y se preparó en medio sólido, a continuación se inocularon los micoplasmas y se incubaron a 37 C durante 24-72 hrs. Una reacción positiva consistió en un halo claro alrededor de las colonias de micoplasma (Whitford 1994).

TIPIFICACIÓN SEROLÓGICA DE LOS AISLADOS DE MICOPLASMA. Con el fin de determinar si todos las cepas aisladas eran serológicamente iguales o diferentes, se preparó un antisuero policlonal en conejo, para ello se utilizó una cepa seleccionada aleatoriamente.

Preparación del antígeno para inmunización. La cepa de *Mycoplasma spp* seleccionada se cultivó en un litro de medio de Hayflick, a 37 C hasta observar cambio de pH ácido, se centrifugó a 15 000 g por 30 min. La pastilla de antígeno se lavó por tres ocasiones con una solución amortiguadora de fosfatos (SAF) pH 7.4, a 15 000 g por 30 min, de acuerdo a la metodología descrita (Tully 1983) (Cuadro 2.1). A partir de un litro de cultivo de micoplasmas se obtuvieron 10 ml de antígeno concentrado. Al concentrado obtenido se le realizó la prueba de esterilidad en agar sangre y caldo tioglicolato para descartar contaminación bacteriana aerobia o anaerobia; posteriormente se conservó en alícuotas de 1 ml en congelación -70 C.

Inoculación de conejos para la obtención del antisuero. El esquema de inmunización que se utilizó fue el de Nortom y Roberts (1967), que ha mostrado ser el más adecuado, por ser los micoplasmas poco antigénicos. Se utilizaron 2 conejos Nueva Zelanda hembras de 2 kg, se efectuó un sangrado previo a la inmunización para determinar la presencia de anticuerpos contra los micoplasmas a inocular por medio de la prueba inhibición de crecimiento (Edward 1954).

El inculo se preparó con 2 ml de antígeno (preparado con la metodología anterior) al cual se le agregaron 2 ml de adyuvante completo de Freund¹, y se homogeneizó con la ayuda de un sonicador² con una intensidad de 4 con intervalos de tiempo de 5 minutos, hasta observar la suspensión bien homogeneizada. El calendario de inmunización incluyó dos fechas de inoculación a los días 0 y 21; y los siguientes días fueron los sangrados. El día cero el conejo se inmunizó utilizando diferentes vías; intradérmica, intramuscular y cojinete plantar, el día 21 se inoculó por vía intramuscular, a partir del día 28 los conejos se sangraron de la vena marginal de la oreja para evaluar el suero. El suero se separó y se esterilizó por filtración por 0.22 μm y se almacenó a -70 C (Cuadro 2.2).

Titulación del antisuero contra *Mycoplasma spp.* Un cultivo de *Mycoplasma spp* en medio de Hayflick con título de 1×10^4 , se utilizó para titular el antisuero policlonal producido en conejo. Se realizó una dilución 1/10 del antisuero policlonal, a 1.8 ml de medio de Hayflick se le agregó 0.2 ml del antisuero inactivado (56 C por

1 Bacto adyuvante, complete Freund 0638-59. Difco, Labs.

2 I.O. Sonik, Bronwill Scientific. Rockerter, New York.

30 minutos), la metodología que se utilizó fue la prueba de inhibición del metabolismo (Taylor-Robinson 1983) (Apéndice 2).

Inhibición del crecimiento. Se prepararon sensidiscos de papel filtro que se impregnaron con el antisuero policlonal de *Mycoplasma* spp. Las 17 cepas de *Mycoplasma* spp aisladas se incubaron en el medio de Hayflick por 24 horas, y se titularon con la prueba de inhibición del metabolismo para obtener un título 1×10^4 , (Taylor-Robinson 1983), posteriormente se les desafió con el antisuero policlonal producido para conocer su efectividad con la prueba de inhibición del crecimiento (Edward 1954, Clyde 1964) (Apéndice 3).

Inmunofluorescencia indirecta. Se remitieron las diferentes cepas aisladas a la Universidad de Guelph, Ontario, Canadá, para su identificación por la técnica de inmunofluorescencia indirecta (Gardella 1983). Las cepas fueron probadas con diferentes antisueros policlonales de referencia contra *M. bovis*, *M. canadense*, *M. mycoides* subsp *mycoides*, *M. mycoides* subsp *capri*, *M. mycoides* subsp *mycoides* large colony (goat), *M. sp californica calf*, *M. capricolum*, *M. sp*, F38, *M. sp Leach grp 7*, *M. sp caprine/ovine grp 6*. Los microorganismos se sembraron en el medio sólido de Hayflick y se incubaron a 37 C por 3 días para observar colonias de micoplasmas perfectamente aislados. A las colonias de cada una de las cepas se les agregó el antisuero policlonal y se incubaron por 2 horas a 37 C, se lavaron y se les agregó posteriormente el conjugado con fluoresceína anti IgG de conejo y se incubaron a 37 C por 1 hora. La fluorescencia de las colonias se observó con un microscopio de luz ultravioleta (Apéndice 4).

CUADRO 2.1

PREPARACION DEL ANTÍGENO. Tully 1983

1000 ml de cultivo de *Mycoplasma* spp 72 horas de incubación hasta un cambio de pH



Centrifugar 30 000 g x 45 minutos*
Descartar el sobrenadante



Sedimento lavado con SAF. pH 7.4
por 3 ocasiones



Resuspender el sedimento en 10 ml



Prueba de esterilidad
Agar sangre/Tioglicolato

Conservar a -70 C **

* Centrifuga refrigerada. Beckman J2-21

** Forma Bio-Freezer, Mod. 80753-002

CUADRO 2.2

**CALENDARIO DE INMUNIZACION REALIZADO
EN CONEJOS CON LA CEPA DE *Mycoplasma* spp. Norton y Roberts 1967**

DIA	VÍA	VOLUMEN	INDICACIONES
0	Cojinete plantar	0.4 ml	Inocular el cojinete plantar de cada miembro con 0.2 ml de la mezcla
	Intramuscular	2.0 ml	Inocular la región superior e inferior de cada hembra con 0.5 ml de la mezcla.
	Intradérmica	0.8 ml	Inocular 8 sitios diferentes sobre la espalda.
21	Intramuscular	2.0 ml	Sangrar para evaluar el suero. Inocular ambos hombros y los músculos de los muslos con 0.5 ml de la mezcla.
28	Sangrar para evaluar el suero		
35	Sangrar para evaluar el suero		
42	Sangrar para evaluar el suero		
56	Sangrar para evaluar el suero		

RESULTADOS

Aislamiento.

De las 50 muestras de secreciones lácteas de casos de mastitis clínicas de bovinos, se obtuvieron 24 (48 %) aislamientos. Se observó en el medio sólido a las 72 horas de incubación en atmósfera de 5 - 10% de CO₂ a 37 °C, la morfología colonial típica de micoplasmas caracterizada por una zona central densa y una zona periférica menos densa (forma de huevo frito), con medidas de 0.5 a 1 mm de diámetro, en el microscopio estereoscópico (Figura 2.1). En las diluciones se presentaron cambios de pH ácido a las 48 horas, ocasionado por la fermentación de la glucosa. La purificación por el proceso de clonación triple, se logró únicamente con 18 cepas (75 %) de los 24 aislados.

Morfología. Los aislados presentaron la morfología típica de micoplasmas con colonias de "huevo frito" con un punto central y periferia granulosa.

Filtrabilidad. Los 18 aislados fueron filtrables por poros de 0.45 µm, los cuales en el medio Hayflick sin antibióticos desarrollaron colonias similares a micoplasma, esto para demostrar la estabilidad morfológica del micoplasma y la ausencia de reversión a formas bacterianas.

Dependencia de esteroides. En la prueba de la digitonina las 18 cepas presentaron halos de inhibición en que el que no se detectó desarrollo de micoplasmas; el observar una inhibición superior a 1 mm fue considerada positiva.

Ausencia de pared celular. La observación al microscopio electrónico se mostró la ausencia de la pared celular, de la cepa seleccionada de micoplasma, y se observó una típica membrana trilaminar, 30,000 aumentos (Figura 2.2). Se determinó que la

mejor preparación para observar a los micoplasmas fue la de colonias en medio sólido.

Identificación bioquímica de los micoplasmas aislados.

Los 18 aislados metabolizaron la glucosa pero no la arginina, y fueron positivas a las pruebas de películas y manchas, fosfatasa alcalina, reducción del tetrazolio e hidrólisis de la caseína.

Identificación serológica de los aislados de micoplasmas.

Titulación del antisuero. El antígeno congelado en la prueba Inhibición del metabolismo presentó un título de 1×10^{12} UCC/0.05 ml. La respuesta del antisuero policlonal producido en conejo con el antígeno del *Mycoplasma* spp presentó un título de 1/512.

Inhibición del crecimiento. El halo de inhibición, para cada una de las 17 cepas de *Mycoplasma* spp probadas fue de 4 mm de diámetro. La cepa control de *Mycoplasma* spp, comparada con su antisuero control presentó el mismo halo de inhibición de 4 mm de diámetro.

Inmunofluorescencia indirecta. Las cepas de *Mycoplasma* spp no reaccionaron con los antisueros específicos probados contra especies conocidas responsables de producir problemas de mastitis como *M. bovis* y *M. canadense*. No reaccionaron con los antisueros de especies proteolíticas como: *M. mycoides* subsp *mycoides*, *M. mycoides* subsp *capri*, *M. mycoides* subsp *mycoides* large colony (goat), *M. sp californica* calf, *M. capricolum*, *M. sp*, F38, *M. sp* Leach grp 7, *M. sp* caprine/ovine grp 6.

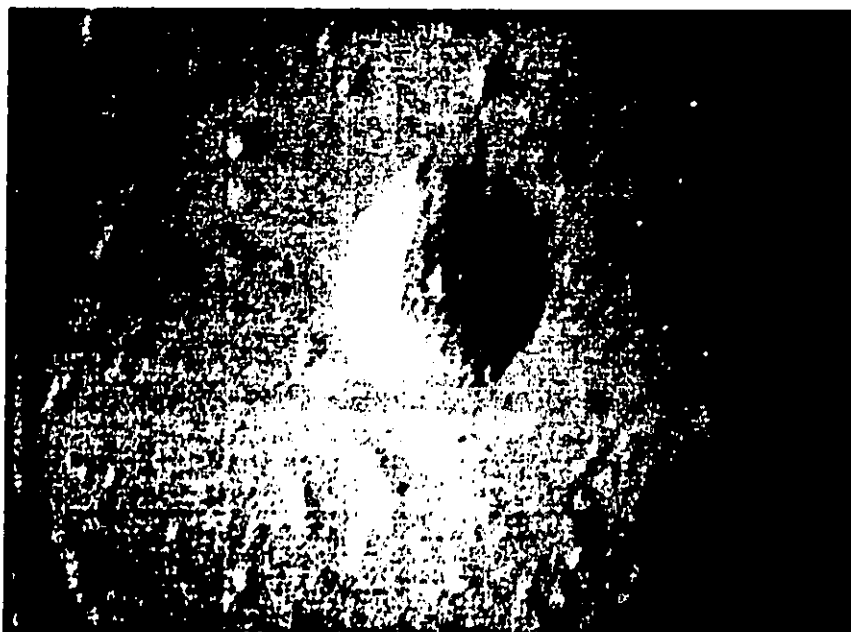


Fig. 2.1 Colonia de *Mycoplasma spp.* cepa problema. Micrografía estereoscópica. (40X)



Fig. 2.2 Membrana trilaminar de *Mycoplasma spp.* cepa problema. Micrografía de transmisión (30,000X)

DISCUSIÓN

La cepa control, *M. bovis*, (cepa Donnetta PG 45) creció en forma adecuada en el medio de Hayflick tanto en líquido como en sólido a las 72 hrs, lo cual fue indicativo de que el medio de cultivo era confiable para el desarrollo de micoplasmas involucrados en problemas de mastitis . El alto porcentaje (48%) de cepas aisladas de las secreciones lácteas que presentaban el suero separado y coágulos o ambas, situación que coincide con lo mencionado por otros investigadores (Jasper 1979, Davison *et al* 1960, Cobo 1978, Blood *et al* 1986, González *et al* 1990), en el sentido de que estos cambios morfológicos en la leche son típicos de problemas de mastitis por micoplasmas. Es recomendable que siempre que se intente el aislamiento de micoplasmas se realicen siembras por diluciones en medio sólido y en líquido, ya que en ocasiones se observa desarrollo de colonias en medio sólido y no se puede recuperar el microorganismo en líquido. Hopps *et al* en 1973, probaron que *M. hyorhinis* no se desarrolla en medio sólido pero sí en medio líquido; así mismo mencionan que 244 de 394 (61.9%) cepas de *M. hyorhinis* no se desarrollaron en el medio sólido (Aluotto *et al* 1970).

Entre las causas por las cuales no se puede recuperar el microorganismo se incluye el incremento del pH, que el micoplasma pierda su viabilidad y no se pueda recuperar, por lo cual sembrando en ambos medios, líquido y sólido, aumentan las probabilidades del aislamiento del microorganismo. El cultivo de micoplasma resultado del primo aislamiento en caldo puede contener una población mezclada de varias especies o bien, variantes de una sola especie, por lo que el aislamiento debe ser clonado antes de realizar pruebas bioquímicas o serológicas. El mantenimiento 18 (75%) de los 24 microorganismos aislados fue muy alta, este porcentaje es indicativo de que las cepas se adaptaron bien a las condiciones de

cultivo y al procedimiento de purificación; 6 (25 %) de las cepas aisladas no se recuperaron con el proceso de purificación, posiblemente no se adaptaron *in vitro* por diferentes causas como la presencia de enzimas y anticuerpos presentes en la leche que hayan inducido al micoplasma a no adaptarse al medio de cultivo. Existen diferentes referencias que indican que micoplasmas aislados del primocultivo son difíciles de adaptarse *in vitro* y en ocasiones no es posible lograr purificarlos e identificarlos como *Mycoplasma* spp. Los micoplasmas que presentan más problemas para aislarlos y purificarlos son los que derivan de ovinos, cerdos, aves, por lo que se realizan diferentes modificaciones en el medio de cultivo añadiendo más nutrimentos, como extractos de fluidos o tejidos sanos de la especie animal de donde proviene la muestra, para así darle al micoplasma factores que necesita para desarrollarse. Puede presentarse la situación de que con la metodología de las diluciones se diluyen algunos factores presentes en los tejidos los cuales son indispensables para que el micoplasma pueda crecer. Sin embargo, a pesar de estas consideraciones, en ocasiones es desafortunada la recuperación del microorganismo *in vitro* (Aluotto *et al* 1970, Whitford *et al* 1994). Los micoplasmas se identifican como *Mycoplasma* spp después de que se ha obtenido un aislado purificado; para ello se realizan diferentes pruebas básicas, las cuales detectan enzimas y requerimientos nutricionales, útiles para su clasificación por medio de la morfología colonial, filtrabilidad, no reversión de formas L, dependencia de esteroides y ausencia de la pared celular como lo indica el Subcomité para la Taxonomía de Micoplasmas (Aluotto *et al* 1970, Razin *et al* 1984, Weisburg *et al* 1989, International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes 1995). Los micoplasmas, así como los ureaplasmas, son microorganismos sensibles a la digitonina, lo cual es indicativo de que requieren de esteroides *in vitro* para poder desarrollarse en medios de cultivo acelulares. Presentan morfología de colonia típica de micoplasma para identificarlos como *Mycoplasma* spp. La habilidad de pasar a través de poros de filtros 0.45 μm que retienen bacterias es una

característica típica de los micoplasmas. Los filtrados depositados en medios de cultivo sólidos se observaron con colonias aisladas que es indicativo de que cada colonia representa la progenie de una sola célula considerada clona. Las colonias transferidas a medio líquido y sólido por tres ocasiones no es una técnica que garantiza la pureza de un cultivo pero tiene la alta probabilidad de que la clonación triple del cultivo representa a un cultivo de un solo micoplasma. Así como la no reversión de formas L, confirmado por subcultivos en el medio de cultivo sin inhibidores. La morfología típica colonial de "huevo frito" sobre la superficie del medio sólido va a depender de las características del medio de cultivo y de las condiciones de incubación, presentando un zona central densa que crece en el interior del medio de cultivo y la periferia en la superficie de crecimiento. La observación al microscopio electrónico mostró claramente la ausencia de pared celular y la presencia de una membrana trilaminar característica con una capa electro opaca y dos capas electrodensas. Es así como el Subcomite de Micoplasmas establece que los microorganismos que presenten los cinco puntos básicos para la identificación de aislados de casos clínicos son considerados como *Mycoplasma spp* (Whitford 1994).

La caracterización y diferenciación de especies de Micoplasmas se realizó por medio de reacciones bioquímicas para determinar la actividad metabólica y enzimática, ya que los micoplasmas están principalmente agrupados por requerir substratos como la glucosa y la arginina, es así que los micoplasmas pueden obtener su energía metabólica a partir de una u otra molécula. Sin embargo, hay micoplasmas que tienen capacidad para utilizar las dos moléculas como fuente de energía. (Freundt 1958).

Las 18 cepas de micoplasmas fueron hábiles para metabolizar la glucosa pero no a la arginina, esta reacción la presentan igualmente las cepas *M. bovirhinis*, *M. bovoculi*, *M. dispar*, *M. mycoides* subsp. *mycoides* y Grupo 7 de Leach. *M. bovis* y *M. canadense* que son especies responsables de problemas de mastitis, no metabolizan la glucosa. La reacción a la arginina es negativa para todas las cepas antes

mencionadas con excepción de *M. canadense* que es positiva. En la reducción del tetrazolio todas las cepas fueron positivas con excepción de *M. canadense* que es variable. En la fosfatasa alcalina fueron positivas las cepas problema *M. bovis* y *M. bovis genitalium*, las cepas restantes fueron negativas.

Las cepas problema reaccionaron positivamente a la hidrólisis de la caseína, reacción similar que presentan las cepas *M. mycoides* subsp. *mycoides* y las cepas de micoplasmas del Grupo 7 de Leach. Las cepas de *M. bovis*, *M. canadense* son negativas a esta prueba. Todo lo anterior indicó que las cepas de *Mycoplasma* spp en estudio, no mostraron reacciones bioquímicas comparables con las diferentes especies de micoplasmas que afectan a los bovinos. Para la identificación plena de los micoplasmas, es necesario recurrir a pruebas de identificación adicionales, como son pruebas serológicas con antisueros específicos policlonales y pruebas moleculares como son: análisis electroforéticos de proteínas celulares en geles de poliacrilamida, análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción y amplificación al azar de DNA polimórfico, para establecer si los micoplasmas son de diferente especie. (Krieg y Holt 1984).

La prueba de inhibición del crecimiento ayudó a establecer que los micoplasmas aislados pertenecen a la misma especie, de acuerdo a su reconocimiento por el antisuero policlonal que se produjo con uno de los micoplasmas aislados. Los conejos son el modelo indicado para producir suero hiperinmune de micoplasmas, con el calendario de inmunización establecido y empleando el antígeno puro sin inactivar, acompañado con adyuvante completo de Freund. Se obtuvo un antisuero con un título de 1/512 considerado un buen título, ya que los micoplasmas son microorganismos poco antigénicos. Dentro del área de micoplasmaología un título 1/64 de un antisuero, se considera bueno y confiable para realizar pruebas serológicas de identificación como la inhibición de crecimiento e inhibición del metabolismo (Tully *et al* 1983).

La inhibición de crecimiento es una prueba extensamente utilizada en la rutina para la identificación de micoplasmas, es una prueba cualitativa y sensible, con

baja especificidad, ya que entre las especies de micoplasmas se presentan pequeñas similitudes en su composición antigénica que pueden ser detectadas por otras pruebas serológicas y que no pueden ser registrados por la inhibición del crecimiento. Esta prueba nos ayuda a indicar la identidad de la especie de micoplasma (Whitford *et al* 1994). La cepa de *Mycoplasma* spp que se utilizó para la producción del antisuero mostró una reacción homóloga, con un halo de inhibición de 4 mm diámetro, considerada como el control positivo, y las 17, cepas en estudio, de *Mycoplasma* spp restantes presentaron la misma homología con el antisuero policlonal. Lo cual sugiere que los 18 aislamientos están relacionados antigénicamente.

En la prueba de inmunofluorescencia indirecta se utilizaron diferentes antisueros para conocer la identidad de los micoplasmas aislados, el estudio fue realizado en la Universidad de Guelph, Canada. Los antisueros policlonales que se probaron fueron antisueros contra *M bovis* y *M canadense* que son los micoplasmas más frecuentemente involucrados en la mastitis bovina. Además se utilizaron antisueros policlonales contra especies de micoplasmas proteolíticos como: *M. mycoides* subsp *mycoides*, *M. mycoides* subsp *capri*, *M. mycoides* subsp *mycoides* large colony (goat), *M. sp california calf*, *M. capricolum*, *M. sp. F38*, *M. sp Leach grp 7*, *M. sp caprine/ovine grp 6*; ya que las cepas de micoplasmas en estudio presentaron un metabolismo proteolítico al reaccionar con la caseína. El estudio de inmunofluorescencia mostró que las cepas de micoplasma no están relacionadas antigénicamente con ninguna de las especies antes mencionadas (Runhke 1994). De acuerdo con los estudios realizados, se podría considerar a los aislamientos como una especie nueva de *Mycoplasma* spp con característica proteolítica hasta ahora no reportada, a reserva de realizar hibridación del ADN con otras especies de micoplasmas. Lo cual se debe informar al Subcomité para *Mycoplasma* para dar conocer al microorganismo como un nuevo micoplasma involucrado en la mastitis bovina. Con las pruebas realizadas hasta ahora se cubren los requisitos que se solicitan para hacer un informe oficial (Kirchhoff *et al* 1996), de un nuevo

Mycoplasma aislado y clasificarlo dentro de la Taxonomía de los micoplasmas y así darle el nombre de la especie correspondiente al *Mycoplasma* (Teel et al 1993, Mohan et al 1994) .

Asignación Taxonómica.

Las propiedades descritas anteriormente de las 18 cepas de *Mycoplasma spp*, aisladas de secreciones lácteas de bovinos con mastitis ; se siguieron con el criterio establecido para la descripción de especies de la clase *Mollicutes* (International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes). La pared celular no está presente. No revierten de formas L cuando se siembran en medios de cultivo sin antibióticos. Son células filtrables por poros de 220 - 450 nanómetros. Producen colonias típicas de huevo frito en el medio sólido y son resistentes a la penicilina. Requieren de esteroides para desarrollar y no hidrolizan a la urea. Estos microorganismos se clasifican en el orden *Mycoplasmatales*, familia *Mycoplasmataceae* y en el genero *Mycoplasma*.

Las 18 cepas de *Mycoplasma spp* tienen las mismas características bioquímicas, biológicas e idénticas propiedades serológicas. La ausencia de relación serológica de estas cepas a otras especies de Micoplasmas, demuestra que ellas representan a una nueva especie no reconocida de micoplasma por el cual se propone el nombre de *Mycoplasma mexicanensis*.

Descripción del *Mycoplasma mexicanensis*

Las colonias tienen formas de huevo estrellado en medio sólido, carecen de pared celular, la temperatura óptima para desarrollar es de 37 C , en el medio de Hayflick de 24 - 48 horas. Requiere de suero para crecer. Fermenta la glucosa, no hidroliza la arginina y la urea. Produce puntos y manchas (Film and spot). Posee actividad de la fosfatasa y reduce el cloruro de tetrazolio en aerobiosis e hidrolizan la caseína. Se aisló de secreciones lácteas de bovinos con problemas de mastitis reincidentes.

LITERATURA CITADA

1. Aluotto BB, Witler RG, Willians Co, Faber JE. Standarized bacteriologic techniques for the characterization of *Mycoplasma* species. *Int J Syst Bacteriol* 1970; 20: 35-58.
2. Avila S, Dominguez J, Rutz H, Valdivieso A, De la Peña A. Evaluación de un brote de mastitis por *Mycoplasma bovis* y otros agentes etiológicos en un hato productor de leche. *Memorias del IX Congreso Nacional de Buiatría, 1983 ; Puebla, Puebla ; México. México D.F: Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos AC, 1983 : 99.*
3. Barber TL. 1976. *Mycoplasma* and bovine mastitis. In: *Laboratory diagnosis of Mycoplasmosis in food animals. Amer. Assn. Vet. Lab. Diag.* 46-51.
4. Blackburn BO. 1976. Biochemical test . In *Laboratory diagnosis of mycoplasmosis in food animals. Stalheim OH. American Associantion of Veterinary Laboratory Diagnosticians.* 96-104.
5. Blood, DC, Henderson JA, Rodostits OM. 1986. *Medicina Veterinaria, 6a Ed. México, Nueva ed. Interamericana. 600 p.*
6. Boatman ES. 1979. Morphology and ultraestructure of the mycoplasmatales In : *The Mycoplasma. Barile MF, Razin S. vol 1. New York : Academic Press. 63-102.*
7. Boughton E. *Mycoplasma bovis* mastitis. *Amer J Vet Res.* 1979 ; 47 : 1082-1084.
8. Clyde WA. 1983. Groth inhibition test. In: *Methods in Micoplasmology, Barile MF, Razin S, Tully JG. Vol. I. New York. Academic Press. 405-410.*
9. Clyde WA. *Mycoplasma* species identification based upon growth inhibition by specific antiserum. *J. Inmunol* 1964 ; 92 :958 -965.

10. Cobo AR. Pérdidas económicas causadas por mastitis. Memorias del 1er. Curso de Actualización sobre mastitis bovina. 1978. México, D.F. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México.
11. Davison I y Stuart P. Isolation of a mycoplasma-like organism from an outbreak of bovine mastitis. Vet Rec 1960 ; 72: 766.
12. Edward DG, Moore WB. A method for determining the utilization the glucose by mycoplasmas. J. Med. Microbiol 1975 ; 8 : 451-454.
13. Edward DG, Hancock JL, Hignett SL. Inhibition of growth of pleuropneumoniae - like organisms by antibody. J Pathol Bacteriol 1954; 68 :23-30.
14. Freundt EA. Film and spot production . In : Methodos in Mycoplasmology. Barile MF, Razin S, Tully JG. Vol 1. New York. Academic Press. 1983 :373-374.
15. Freundt EA. The Mycoplasmatacea. Munksgaard, Copenhagen. 1958.
16. Freundt EA. The Mycoplasmataceae (The pleuropneumoniae Group of Organisms) : Morphology, biology, and Taxonomy . Munksgaard, Copenhagen.
17. Freundt, E.A.: Culture media for classical Mycoplasma. In: Methods in Mycoplasmology. Barile MF, Razin S, Tully JG. Vol. I. New York. Academic Press. 1983 : 79-85.
18. Gardella SR, Delgiudice RA, Tully GJ. Inmunofluorescence. In : Methods in Mycoplasmology. Barile MF, Razin S, Tully JG. Vol. I. New York. Academic Press. 1983 : 431-440.
19. González RN, Sear PM, Merrill RA. Bovine mycoplasmal mastitis in New York State dairy herds, 1977-1988. International Symposium on bovine mastitis. 1990 mayo 15-18; Indianapolis, New York. 1990 : 53-61.
20. Hale HH, Helmboldt CF, Plastringe WN, Stula EF. Bovine mastitis caused by a mycoplasma species. The Cornell Veterinarian 1962 ; 52 : 582-591.
21. Hernández A L, González GA, Campos RV, Payán RM, Jaramillo ML, Pérez DM. Reporte sobre un brote de mastitis causado por Mycoplasma bovis en un hato lechero Memorias del X Congreso Nacional de Buiatría ; 1984 ; Acapulco,

- Guerrero, México. México D.F. Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos AC, 1984 : 608-612.
22. International Commite on Systematic Bacteriology Subcommmittee on the Taxonomic of Mollicutes. Revised Minimun standars for description of new species of the class mollicutes (Division Renericutes). In. J. of Systematic bacteriology 1995, 45 (3) : 605-612.
23. Jasper DE, 1994. Mycoplasma and bovine mastitis, In Mycoplasmosis animals : Laboratory diagnosis, eds, Whitford HW, Rosenbush RF. Laverman L. Iowa state University Press Ames , Iowa. 62-7.
24. Jasper DE, Dellinger JD, Rollins MH, Hakanson HD. Prevalence of mycoplasmal mastitis in California. Am J Vet Res. 1979; 40 : 1043-1047.
25. Jasper DE. Bovine mycoplasmal mastitis. Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine. 1981; 25 : 121-159.
26. Jasper DE: Bovine mycoplasmal mastitis. Am Vet Med. Assoc. 1979; 75: 1072-1074.
27. Kirchhoff H, Schmidt R, Lehmann H, Clark HW y Hill AC. *Mycoplasma alephantis* sp. nov., a new species from elephants. In. J. of Systematic bacteriology 1996, 46 (2) :437-441.
28. Krieg C. DNA looping. J. bacteriol 1984 ; 102 :855-861.
29. Langford EV, Ruhnke HL, Onoviran O. *Mycoplasma canadense* , a new bovine species. Int J System Bact . 1976; 26 : 212-219.
30. Martin HH, Schilfw, Shiefer HG. Differentation of Mycoplasma from bacterial protoplast L-forms by assays for penicillin binding proteins. Arch Microbiol 1980 ; 127 : 297-299.
31. Mohan K, Foggin C, Pawandiwa A and Sadza M. Phenetic characterization of *Mycoplasma* sp from crocodiles (*Crocodylus niloticus*). 94th ASM General Meeting. Univ. Of Zinbabwe and Harare and veterinary Research Laboratory. 1994 : 172.
32. National Mastitis Council Inc. Laboratory and field handbook on bovine mastitis. Arlington, VA : W.D. Hoard and Sons Co, 1987.

33. Norton HE, Roberts RJ. Production of antimycoplasmas PPLO antibodies in rabbits. *Proc Soc Exp Biol Med* 1967 ; 125 : 538-543.
34. Razin S, Freundt E. Division Tenericutes. Div. Nov. (G. v. p. 63) Class I. Mollicutes In : Kriey NR, Holt JH. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 1. Baltimore : Willians and Wilkins, 1984 :781-787.
35. Razin S, Tully JG. Cholesterol requirements of Mycoplasmas . *J. Bacteriol* 1970 ; 102 : 306-310.
36. Runkhen L 1994. Informe del estudio de diagnóstico realizado en Guelph, Canada.
37. Taylor-Robinson D. Metabolismo inhibition Test. In: *Methods in Mycoplasmaology*. Barile MF, Razin S, Tully JG. Vol. I. New York. Academic Press. 1983 : 100-110.
38. Teel L, Finelli M, Johnson S. Isolation of Mycoplasma species from bronchoalveolar lavage of HIV and non-HIV patients. 93th ASM General Meeting. Henry M. Jackson Foundation and Walter Reed Army Medical Center 1993 :165
39. Tully J.G. Cloning and filtration techniques for mycoplasma. In: *Methods in Mycoplasmaology*. Barile MF, Razin S, Tully JG. Vol. I. New York. Academic Press. 1983 : 173-177.
40. Tully JG, Clyde WA, Seterfet LB. Preparation of Mycoplasma antisera in Mycoplasma. techniques. Course International Organization for Mycoplasmaology (I.O.M.) 1983 julio. University de Bordeaux and Institute National of Recherche Agronomique (I.N.R.A). 1983 :149-153.
41. Tully JG. Test for digitonin sensitivity and sterol requirement . In: *Methods in Mycoplasmaology*. Barile MF, Razin S, Tully JG. Vol. I. New York. Academic Press. 1983 : 355-362.
42. Weisburg WC, Tully JG, Rose DL, Petzel JP, Oyaizu H, Yang D, *et al.* A philogenetic analysis of the Mycoplasma: Bases for their classification. *J. Bacteriol*. 1989 ;171 :6455-6467.

43. Whitford HW, Rosenbusch, RF. Mycoplasmosis in animals: Laboratory Diagnosis. 1st. Ed . New York : Iowa State Univ. Press.1994.

ADHERENCIA Y DAÑO CELULAR DE UNA CEPA DE MICOPLASMA AISLADA DE BOVINOS CON PROBLEMAS DE MASTITIS

INTRODUCCION

Los micoplasmas son habitantes normales de las mucosas de los animales y el hombre. Son microorganismos adaptados a su huésped y colonizan frecuentemente superficies mucosas del aparato respiratorio superior y aparato genital. Esta adaptación esta relacionada con la presencia de factores nutricionales y de receptores específicos sobre la célula huésped (Barber 1976, Jasper 1979, Gyles 1993). Estos receptores interactúan de manera complementaria con las adhesinas de los micoplasmas (Razin 1985).

La adherencia es el mecanismo por el cual los microorganismos se establecen y colonizan a su huésped y es considerada como el primer paso en la patogénesis de muchas infecciones. Las células epiteliales representan la primera barrera que los organismos encuentran para colonizar, por lo cual es necesario conocer algunos aspectos importantes de la adherencia bacteriana con especial énfasis en las células epiteliales. (Ofek, *et al* 1980). La adherencia de los micoplasmas a las células huésped es poco estudiado, sin embargo algunas especies presentan un organelo especializado que funciona como una estructura adherente. Este organelo es considerado responsable de la motilidad, *M. pneumoniae*, *M. pulmonis*, *M. gallisepticum*, *M. genitalium* y *Mycoplasma mobile* se deslizan en superficies de plástico y cristales, este mecanismo es importante para su patogenicidad (Dybvig *et al* 1996). Una de las especies más estudiada es *M. pneumoniae*, patógeno del humano que causa neumonía y traqueobronquitis (Clyde 1983, Krause y Taylor-Robinson 1992), actualmente se le conocen diferentes adhesinas (PI, HMW3, P30)

que aparentemente se encuentran localizadas en una estructura con una extensión membranal similar a un citoesqueleto (Meng y Pfister 1980, Gobe *et al* 1981), responsable en la citoadherencia. Poco se conoce de los receptores que promueven la adherencia de *M. pneumoniae* a la célula huésped, hasta ahora se le conocen únicamente dos receptores implicados, la sialoglicoproteína y glicolípidos sulfatados (Dybvig *et al* 1996).

Dentro de los micoplasmas que producen mastitis en los bovinos, *M. bovis* es considerado el más patógeno ya que en diferentes estudios se ha observado que produce un efecto citopático sobre cultivos celulares. El daño celular es producido por la síntesis de una toxina que llega a producir eosinofilia en la glándula mamaria; se ha reproducido experimentalmente la mastitis en bovinos cuando se inocula el cultivo bacteriano (Hale *et al* 1962, Ruhnke *et al* 1976, Bennett y Jasper 1977, Jasper 1977). Igualmente se ha observado artritis (Hjerpe y Knight 1972), alteraciones urogenitales (Hartman *et al* 1964), problemas respiratorios (Kchoc *et al* 1967) y aborto (Stalheim y Proctor 1976), cuando se inocula en cada uno de los casos el cultivo en forma experimental. En ovinos *M. bovis* se ha aislado de problemas de mastitis y neumonía.

Se ha estudiado la citoadhesión de *M. bovis* en células embrionarias de pulmón de bovino presenta una adhesina P26 que interactúa con la sialoglicoproteína y se demostró la presencia de Vsps (proteínas superficiales variables) involucradas en la citoadhesión (Sachse *et al* 1996, Behrens *et al* 1996). *M. canadense* se ha aislado de la glándula mamaria, aparato genital, y del aparato respiratorio (Jasper 1977, Dellinger *et al* 1977), y se ha realizado la inoculación experimental en la glándula mamaria produciendo mastitis en bovinos. Los micoplasmas antes mencionados son considerados microorganismos patógenos en bovinos, por los diferentes experimentos que se les realizaron.

Es importante establecer si las 18 cepas de micoplasmas con actividad proteolítica, aisladas de muestras de leches de bovinos con problemas de mastitis recurrentes en diferentes hatos de la zona Tizayuca, Hidalgo son patógenas o comensales de

la glándula mamaria. Para considerar a la cepa de *Mycoplasma* spp, con actividad proteolítica, patógena de la glándula mamaria de bovinos, debe tener la capacidad de persistir en un cultivo celular, adherirse y producir daño celular.

El propósito de este estudio fue el conocer la adhesión de *Mycoplasma* spp con actividad proteolítica en un cultivo celular primario de glándula mamaria para establecer la capacidad de adherencia y posible daño celular, mediante la microscopía electrónica de barrido, microscopía electrónica de transmisión y mediante la liberación de la enzima deshidrogenasa láctica.

MATERIALES Y MÉTODOS

MICROORGANISMOS. Se utilizaron para este estudio cepas de micoplasma. Aislamientos de *Mycoplasma* spp con actividad proteolítica, obtenidos de secreciones lácteas de bovinos con problemas de mastitis reincidentes; actividad que se determinó con la prueba bioquímica hidrólisis de la caseína. Se utilizaron dos cepas de referencia como controles, *Mycoplasma bovis* cepa *Donnnetta*¹ y *Mycoplasma canadense*². Las cepas se cultivaron en el medio de Hayflick a 37 C para obtener la fase de crecimiento logarítmica, con una concentración de 1×10^4 micoplasmas por ml (Whitford *et al* 1994).

Se utilizaron igualmente en este estudio *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, cepas que se aislaron de secreciones lácteas de casos agudos de mastitis bovina. La cepa de *Escherichia coli*, se cultivó en caldo tripticasa soya y se incubó a 37 C por 24 h. La cepa de *Staphylococcus aureus*, se cultivó en caldo nutritivo y se incubó a 37 C por 24 h. Las cepas se estandarizaron al 0.5 del Nefelómetro de Mc Farland para obtener la concentración bacteriana de inoculación (Carter 1989).

CULTIVO CELULAR PRIMARIO DE CÉLULAS EPITELIALES DE GLÁNDULA MAMARIA DE BOVINO. Se procesaron 170 glándulas mamarias macroscópicamente sanas, las cuales se obtuvieron de bovinos en el rastro. A cada glándula, paralelamente al procesamiento del cultivo celular, se les realizó la bacteriología general (Carter 1989) para conocer la carga bacteriana para ser descartadas o bien ser procesadas para obtener el cultivo celular. A cada glándula mamaria se le lavó y disecó. Se realizaron cortes muy pequeños del tejido

1-Cepa *M. bovis* cepa *Donnnetta*. Universidad de Aharus, Dinamarca

2- Cepa *M. canadense*. Universidad de Aharus, Dinamarca.

MATERIALES Y MÉTODOS

MICROORGANISMOS. Se utilizaron para este estudio cepas de micoplasma. Aislamientos de *Mycoplasma* spp con actividad proteolítica, obtenidos de secreciones lácteas de bovinos con problemas de mastitis reincidentes; actividad que se determinó con la prueba bioquímica hidrólisis de la caseína. Se utilizaron dos cepas de referencia como controles, *Mycoplasma bovis* cepa *Donnnetta*¹ y *Mycoplasma canadense*². Las cepas se cultivaron en el medio de Hayflick a 37 C para obtener la fase de crecimiento logarítmica, con una concentración de 1x10⁴ micoplasmas por ml (Whitford *et al* 1994).

Se utilizaron igualmente en este estudio *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, cepas que se aislaron de secreciones lácteas de casos agudos de mastitis bovina. La cepa de *Escherichia coli*, se cultivó en caldo tripticasa soya y se incubó a 37 C por 24 h. La cepa de *Staphylococcus aureus*, se cultivó en caldo nutritivo y se incubó a 37 C por 24 h. Las cepas de estandarizaron al 0.5 del Nefelómetro de Mc Farland para obtener la concentración bacteriana de inoculación (Carter 1989).

CULTIVO CELULAR PRIMARIO DE CÉLULAS EPITELIALES DE GLÁNDULA MAMARIA DE BOVINO. Se procesaron 170 glándulas mamarias macroscópicamente sanas, las cuales se obtuvieron de bovinos en el rastro. A cada glándula, paralelamente al procesamiento del cultivo celular, se les realizó la bacteriología general (Carter 1989) para conocer la carga bacteriana para ser descartadas o bien ser procesadas para obtener el cultivo celular. A cada glándula mamaria se le lavó y disecó. Se realizaron cortes muy pequeños del tejido

.....
1-Cepa *M. bovis* cepa *Donnnetta*. Universidad de Aarhus, Dinamarca

2- Cepa *M. canadense*. Universidad de Aarhus, Dinamarca.

epitelial de los senos láctíferos. Se siguió la metodología indicada por Sastrojojo (Sastrojojo *et al* 1986) (Apéndice 5). El tejido se sumergió en alcohol al 70 % y se retiró rápidamente, posteriormente se lavó con una solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2 (SAF). La SAF fue decantada y reemplazada por una solución de tripsina¹ al 0.2% conteniendo penicilina 100,000 UI / por ml, se dejó actuar en agitación por 30 min. La tripsina se decantó y se centrifugó² a 2,000 ó 3,000 g /5 min. El botón de células se lavó con PBS por tres ocasiones y en el último lavado se filtró con una gasa estéril. Las células obtenidas se cuantificaron en un hemocitómetro utilizando azul de tripan. La suspensión de células viables 1×10^3 por ml, se cultivaron en medio 199 HEPES modificado³, suplementado con 7 % de suero fetal bovino⁴, gentamicina⁵ y estreptomycin⁶ 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Las células se cultivaron en cubreobjetos de cristal en placas de 24 pozos y se incubaron a 37 C en una estufa con 10% de CO₂⁷. El medio de cultivo se cambió cada 5-6 días. Las células fueron observadas regularmente en el microscopio invertido⁸, hasta obtener una monocapa de células.

La monocapa se estableció libre de micoplasmas mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta con antisueros específicos contra especies de micoplasmas *Mycoplasma spp*, *Mycoplasma bovis* cepa *Donnnetta* y *Mycoplasma canadense* (Gardella *et al* 1983). La monocapa de células fue infectada con cada una

-
1. Tripsina 1:250. Sigma
 2. Centrifuga refrigerada.
 3. Medio 199 HEPES, Sigma.
 4. Suero Fetal Bovino. Sigma
 5. Gentamicina. Shering Ploun
 6. Estreptomycin. Sigma
 7. Estufa de CO₂. Forma Scientilic .
 8. Microscopio Invertido. Nikon TMS. Japan.

de las cepas a probar para realizar los ensayos de adherencia, mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta, microscopía electrónica de barrido, y para evaluar el daño tisular inducido por los micoplasmas, mediante la microscopía electrónica de transmisión y por liberación de la enzima deshidrogenasa láctica. Un total de cinco ensayos se realizaron en el mismo lote de células con sus respectivos controles, con tres replicas para cada ensayo .

ENSAYOS DE ADHERENCIA .

Hemoadsorción. Se realizaron diluciones decimales de micoplasmas *M. bovis*, *M. canadense* y *Mycoplasma spp* cepa en estudio, fueron sembradas cada una de las suspensiones en medio sólido de Hayflick con el fin de obtener colonias perfectamente aisladas. Las cajas fueron incubadas de 24 a 72 horas a 37 C. En dos cajas de medio sólido con colonias perfectamente aisladas una se cubrió con una suspensión de eritrocitos de cuye al 0.5%, y la otra caja con una suspensión de eritrocitos de bovino al 0.5%, procurando cubrir las colonias de micoplasmas. Fueron incubadas a 37 C por 30 minutos. Se incubó igualmente una caja de medio sólido con colonias como control negativo sin eritrocitos, se lavaron con SAF pH 7.4 y se observaron las colonias con un microscopio estereoscópico¹ (Manchee y Taylor-Robinson 1968).

Inmunofluorescencia Indirecta. Los cubreobjetos de células epiteliales infectadas se utilizaron como control para comprobar la presencia de *M. bovis*, *M. canadense*, *Mycoplasma spp*, cepas en estudio adheridas a las células epiteliales. Se realizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta (Gardella *et al* 1983). Se utilizó como

1. Microscopio Estereoscopio

anticuerpo primario los sueros policlonales específicos para *Mycoplasma spp*¹ cepa en estudio, *Mycoplasma bovis* y *Mycoplasma canadense*.

Se utilizó como anticuerpo secundario el conjugado anti IgG de conejo con isotiocianato de fluoresceína². Para el control negativo se utilizaron células epiteliales sin infectar.

Microscopía electrónica de barrido.

La monocapa de células epiteliales obtenidas en el cultivo celular primario se lavaron con SAF pH 7.4, una sola vez, para eliminar residuos de medio de cultivo y células muertas del cubreobjetos. Las células se infectaron con 300 microlitros de la suspensión con 4 unidades cambio de color, de cada una de las cepas de micoplasmas, *Mycoplasma bovis*, *M. canadense*, *Mycoplasma* cepa en estudio *E. coli*, y *S. aureus*. Se incubaron a 37 C por 30, 45, 60, 120 minutos hasta 24 horas, para determinar el tiempo de adherencia, ensayo que se realizó por triplicado.

Las células epiteliales se lavaron con SAF pH 7.4 y se fijaron con glutaraldehído al 1%, para continuar con la postfijación con tetraóxido de osmio al 1%. Las muestras se desecaron al punto crítico y se ionizaron con oro. Posteriormente se observaron en el microscopio electrónico de barrido³ (Seviour *et al* 1984). Se contaron directamente en la pantalla del microscopio de barrido los micoplasmas adheridos por célula epitelial infectada. Se consideró únicamente para la cuantificación el 10% de la población total de las células pegadas en el cubreobjetos. Las muestras de células epiteliales al presentar eritrocitos, macrófagos o fibroblastos fueron

1 Anticuerpo policlonal de *Mycoplasma spp*. Depto. Microbiología e Inmunología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia,

2. Conjugado fluoresceinado anti IgG de conejo. Sigma

3. Microscopio Electrónico de Barrido y IEOL, ISM 36F

descartas del estudio. La adherencia para cada una de las cepas de micoplasmas se determinó obteniendo la media de cada uno de los ensayos por triplicado y se realizó la prueba *t* student para la diferencia de medias. Se comparó la cepa de *Mycoplasma* spp en estudio con *M. bovis*, y la cepa de *Mycoplasma* spp en estudio con *M. canadense*.

ENSAYO DEL DAÑO CELULAR.

Microscopía Electrónica de Transmisión.

Las células epiteliales de glándula mamaria, infectadas y no infectadas se procesaron para microscopía electrónica de transmisión para observar la adherencia de los micoplasmas a las células y el posible daño ocasionado. Las muestras se lavaron con PBS pH 7.4, se fijaron con glutaraldehído al 2.5% a temperatura ambiente por 60 minutos. Se lavó la monocapa con PBS pH 7.4 por 15 minutos y se fijó en tetraóxido de osmio por 60 minutos a temperatura ambiente, se deshidrataron realizando lavados con etanol en concentración ascendente, cada lavado fue de 15 minutos para cada concentración. Las muestras fueron incluidas en resina Epon, cortadas y teñidas con citrato y acetato de uranilo y fueron observadas en el microscopio electrónico de transmisión¹ (Philips DM 1978, Boatman 1979).

Deshidrogenasa láctica.

Se determinó la presencia de la enzima deshidrogenasa láctica (LDH), como indicativo de daño de la cepa de micoplasma sobre la célula epitelial de glándula

1. Microscopio electrónico de transmisión.

mamaria, mediante el uso de reactivos estandarizados¹. Esta enzima es liberada de las células cuando existe una ligera alteración de la membrana, el daño celular se cuantificó en porcentajes con respecto a la enzima liberada. Después de 30 minutos, tiempo de infección, se tomaron las muestras de las diferentes repeticiones que se guardaron en refrigeración a 4 C para realizar el ensayo, las muestras que se consideraron fueron: sobrenadante de la suspensión infectante de cada una de las cepas, la SAF pH 7.4 utilizada en el lavado de cada uno de los pozos infectados y no infectados por 5 min, el inóculo infectante 1×10^4 de las cepas de micoplasmas, el sobrenadante del lavado de las células antes de la infección, SAF pH 7.4 y el medio 199 Hepes.

Se realizó la metodología indicada por la compañía comercial y posteriormente se cuantificó el porcentaje de daño celular (Apéndice 6). Se removió el medio base de las células adheridas y se lavaron con SAF a un pH 7.4. Se agregaron 100 ml de la suspensión bacteriana de cada una de las cepas de micoplasmas a una concentración de 1×10^4 por ml. Posteriormente se incubaron las células a 37 C, 7% CO₂ por 30 min de incubación. Se tomaron 100 ml de sobrenadante de cada pozo sin alterar la monocapa, se transfirió a una placa de 96 pozos con fondo en U, posteriormente se centrifugó a 1,400 g por 15 minutos con el fin de eliminar residuos celulares. El sobrenadante se tomó con cuidado y se transfirió nuevamente a otra placa de 96 pozos fondo plano. Se determinó la actividad de la LDH en el sobrenadante, añadiendo 100 ml del reactivo A, deaformazan, "reacción mezcla" a cada pozo, se incubó por 30 min a temperatura ambiente, la reacción se protegió de la luz. Se agregó el reactivo B, cloruro de tetrazolio yodado, y se midió la adsorbancia de las muestras a 490 o 492 nm, de

1. Reactivos estandarizados. Detection KIT (LDH). Laboratorio. Boehringer, Mannheim.

acuerdo a los filtros usados en el lector ELISA¹. Como referencia la longitud de onda debe ser mayor que 600 nm. Se consideraron los siguientes controles con respecto a los reactivos estandarizados, a los cuales se les agregaron 100 ml del reactivo A y del reactivo B.

- Control blanco : pozos por triplicado con 200 ml de SAF pH 7.4.
- Control de baja concentración: 100 ml de SAF 7.4 de los pozos por triplicado que contiene células.
- Control de alta concentración: 100 ml del pozo de la suspensión de células por triplicado que se le agregó 100 ml de la solución Tritón X-100².

1. Lector de ELISA. Espectrofotometro. Microplate reader. model Bio Rad.
2. Tritón X-100. Laboratorio. Boehringer Mannheim.

RESULTADOS

Hemoadsorción

Las colonias de micoplasmas, cepas de *M. bovis*, *Mycoplasma* spp en estudio, con actividad proteolítica, tuvieron la capacidad de hemoadsorber eritrocitos de cuye y de bovino, incubadas a 37 C por 30 minutos. *M. canadense* no hemoadsorbió eritrocitos de cuye y de bovino a 37 C por 30 min de incubación.

Citoadsorción

Las cepas de *M. bovis*, *Mycoplasma* spp en estudio y *M. canadense* se adhirieron a las células epiteliales de glándula mamaria incubadas a 37 C por 30 minutos.

Adherencia de micoplasmas

Se determinó que el tiempo de 30 minutos de incubación a 37 C, fue el tiempo en que se observó mejor la adherencia de las cepas de micoplasmas estudiadas, sin que se observara severo daño celular.

Microscopía electrónica de barrido

Se observaron las células de micoplasmas llegaron a medir 200 nm, presentaron formas irregulares característica de su pleomorfismo por la ausencia de la pared celular, (Fig. 3.1).

Las células epiteliales de glándula mamaria, se observaron con forma poligonal con medidas de hasta 10 μm , (Fig . 3.2).

Se observaron micoplasmas adheridos a las células epiteliales, las células presentaron modificaciones en su morfología original de poligonal a redondeadas, evento que sucedió a los 30 minutos, con las infecciones por *M. bovis* y *Mycoplasma* spp en estudio (Fig 3.3). Las células con la cepa de *M. canadense* adherida presentaron mínima alteración morfológica.

En la cuantificación de las cepas de micoplasma adheridas a las células epiteliales, se observó que no se encontraron diferencias significativas entre las medias de los grupos y repeticiones de los micoplasmas en estudio (Cuadro 3.1).

La cepa de *E. coli* se observó unida a las células epiteliales a los 30 min de incubación y se observaron más de 8 bacterias por célula. Igualmente *E. coli* en la célula infectada junto con las cepas de micoplasma se observó menos adherente con 2 a 4 bacterias por célula, comparando este resultado cuando la cepa de *E. coli* estaba como único microorganismo infectante (Fig 3.4). Así mismo se observó que en la cepa de *E. coli* se encontraban micoplasmas adheridos a su pared celular.

La cepa de *Staphylococcus aureus* se observó poco adherida a las células epiteliales de 4 a 6 bacterias por célula. *S. aureus* se observó menos adherida de 1 a 2 bacterias por cada célula epitelial, situación que se daba cuando la infección se realizó junto con la cepa de micoplasma.

DAÑO CELULAR.

Microscopía electrónica de transmisión.

Las cepas de micoplasmas *M. bovis*, *M. canadense* y *Mycoplasma spp* cepa en estudio se presentaron unidas a la membrana de la célula epitelial (Fig 3.5) y se observó ligera pérdida de integridad de la membrana que se interpreta como daño con la cepa de *M. bovis*, *Mycoplasma spp* cepa en estudio y no se observó daño con la cepa de *M. canadense*. Así mismo los micoplasmas que se encontraban adheridos a la membrana de la célula epitelial, presentaban una especie de proyección de su membrana como parte de esta unión (Fig 3.6)

E. coli se observó adherida a las células epiteliales a los 30 minutos de incubación, se sugiere que la adherencia está mediada por la fimbria, (Fig 3.7).

Staphylococcus aureus no se observó adherida en varios campos de observación y en diferentes cortes de la muestra.

Deshidrogenasa láctica.

El método utilizado no logró detectar la enzima deshidrogenasa láctica a los 30 minutos de infección a 37 C, tiempo en el que se promovió la adherencia de los micoplasmas a la célula epitelial y en que se llegaron a observar alteraciones morfológicas. Los reactivos estandarizados no fueron capaces de detectar daño celular temprano.

CUADRO 3.1

**INTERACCIÓN DE MICOPLASMAS A LAS CÉLULAS EPITELIALES A LOS
30 MINUTOS DE INFECCIÓN**

Ensayo estudio	<i>M.bovis</i>	<i>M.canadense</i>	<i>Mycoplasma spp</i> en
1	90	60	70
2	70	40	65
3	85	42	60
TOTAL	245	142	195
X	81.6*	47.3 *	65*

Número de micoplasmas unidos a la célula epitelial de glándula mamaria, en tres repeticiones. Microscopía de barrido

(*) . No se encontró diferencia significativa entre los grupos y las repeticiones de los micoplasmas en estudio $P < 0.05$.

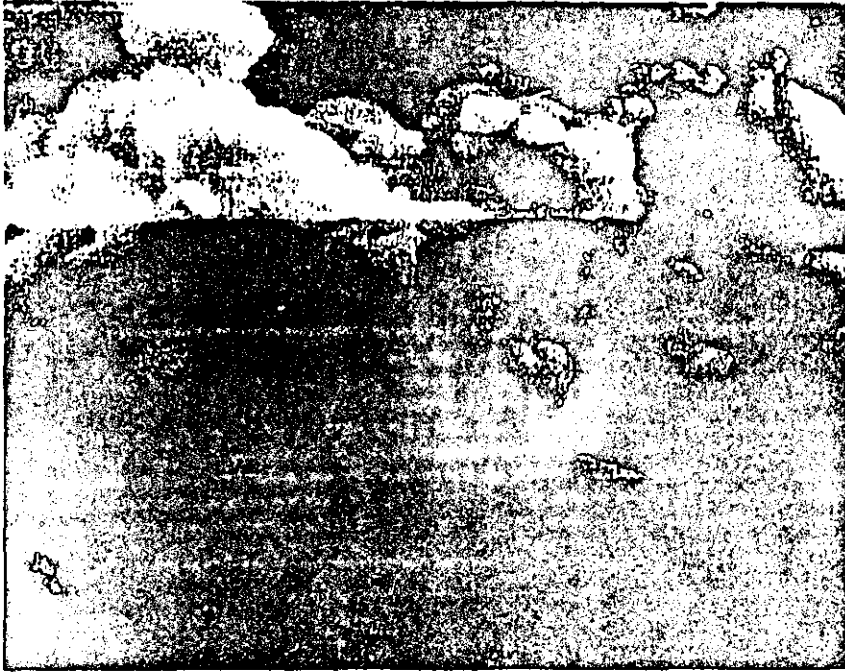


Fig. 3.3 Adherencia de *Mycoplasma spp.* cepa en estudio. Micrografía de barrido. (25.000 X)



Fig. 3.4 Células epiteliales de glándula mamaria infectadas con *E. coli*. Micrografía de barrido. (10.000X)

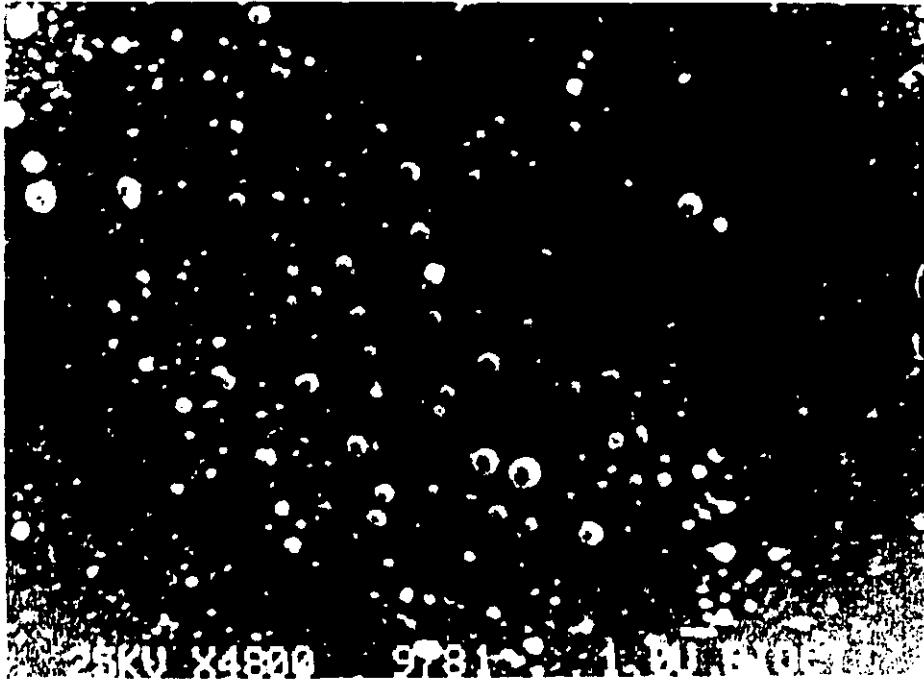


Fig. 3.1 Células de *Mycoplasma* spp. cepa en estudio. Micrografía de barrido, (4.800X)

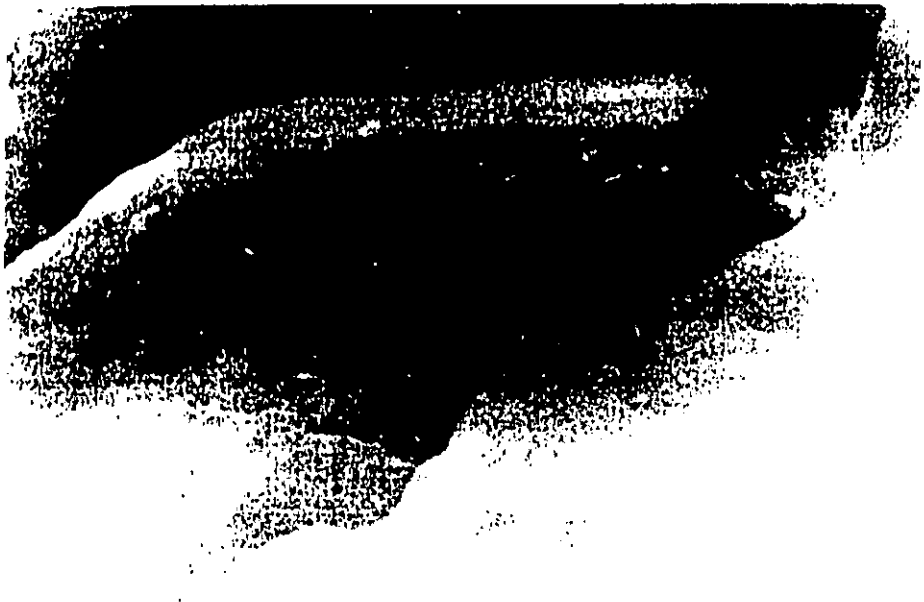


Fig. 3.2 Célula epitelial de glándula mamaria sin infectar. Micrografía de barrido (4.800X)



Fig. 3.3 Adherencia de *Mycoplasma spp.* cepa en estudio. Micrografía de barrido. (25,000 X)

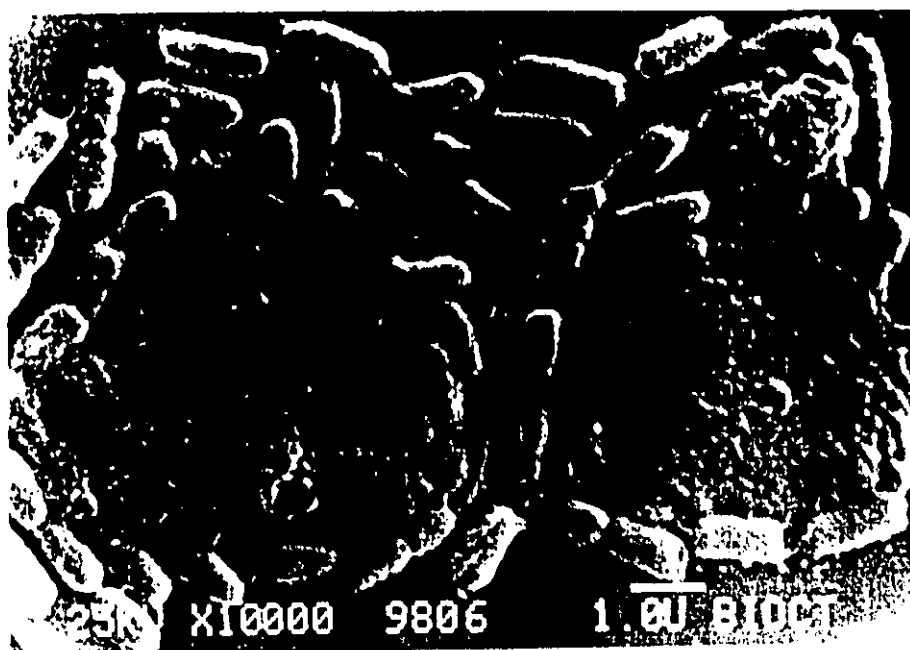


Fig. 3.4 Células epiteliales de glándula mamaria infectadas con *E. coli*. Micrografía de barrido. (10,000X)



Fig. 3.5 Adherencia de *Mycoplasma spp.* cepa problema en la célula epitelial de glándula mamaria. Micrografía de transmisión. (25,000X)



Fig. 3.6 Adherencia de *Mycoplasma spp.* por medio de un puente a la célula epitelial. Micrografía de transmisión (10,000X)

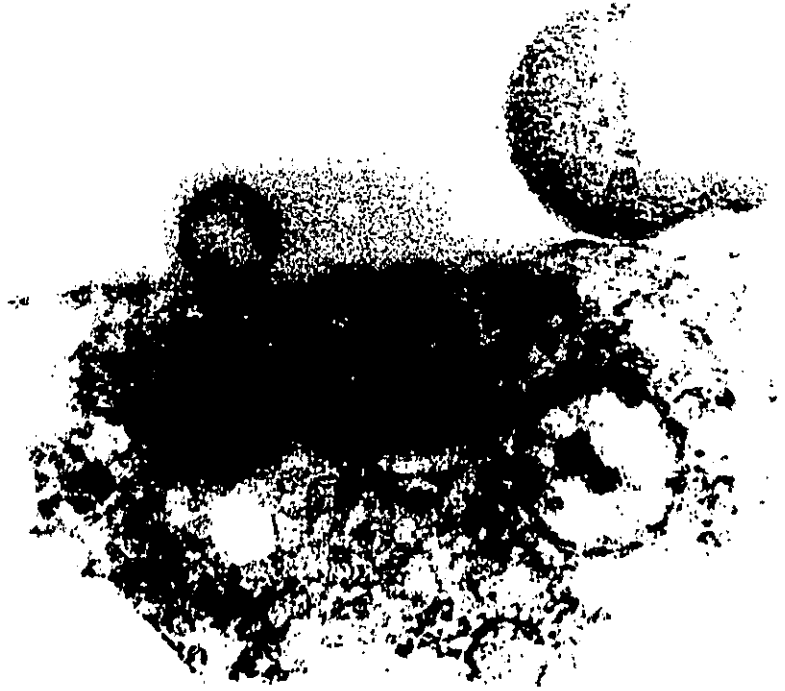


Fig. 3.7 Célula epitelial de glándula mamaria infectada con el *Mycoplasma spp.* cepa en estudio. Micrografía de transmisión. (25,000X)

DISCUSIÓN

Las especies de micoplasmas *M. bovis*, *M. canadense* y *Mycoplasma* spp, involucrados en problemas de mastitis, son diferentes entre sí en sus características bioquímicas. Se conoce la actividad de algunas especies de micoplasmas en la glándula mamaria; para ello se realizaron diferentes estudios de inoculación experimental, e histopatología para *M. bovis* y *M. canadense*; así como el aislamiento de estos microorganismos en muestras de leche de casos de mastitis y de tanque para monitorear el micoplasma más frecuentemente involucrado y así conocer el estado de los hatos lecheros (Whitford *et al* 1994). Es así que la especie de *M bovis* es considerada la especie más aislada de problemas de mastitis e involucrada en problemas respiratorios de los bovinos (Kirk, *et al* 1997). A *M. bovis* se le han realizado diferentes estudios, cultivos del micoplasma para realizar infecciones en cultivos celulares de traquea de ratón y el comportamiento de la toxina que lesiona tejidos, con el fin de conocer su patogenicidad. El mecanismo de patogenicidad de algunos micoplasmas no está muy claro, por lo cual es necesario establecer un modelo *in vitro* confiable (Gourlay *et al* 1979) para poder investigar las propiedades patógenas de la cepa de *Mycoplasma* spp aislada de muestras de leche de bovinos con problemas reincidentes de mastitis en Tizayuca Hidalgo, México.

La ausencia de la pared celular y los componentes responsables de la adherencia, adhesinas, forman parte de la membrana de la célula. Esta ausencia de la pared celular facilita el contacto directo de las adhesinas membranales del micoplasma con los receptores específicos sobre la membrana de la célula huésped; creando una condición de fusión de dos membranas que transfiere o intercambia componentes de membrana. Este estrecho contacto crea un microambiente

facilitando la acumulación de productos metabólicos del micoplasma (Razin *et al* 1992).

La adhesión de micoplasma a la célula huésped es un prerrequisito para la colonización y para la infección. La pérdida de la adhesión por mutaciones resulta en la pérdida de la infectividad y reversión de la citoadherencia y de la virulencia (Razin *et al* 1992).

La hemoadsorción, propiedad que refleja usualmente la capacidad de los micoplasmas para adherirse, ha sido estudiada en *Mycoplasma pneumoniae* y se sabe que está asociada a la virulencia del microorganismo (Razin 1985). La cepa en estudio de *Mycoplasma spp* y *M. bovis* tienen la capacidad de hemoadsorber eritrocitos de cuye y de bovino en 30 minutos a 37 C de incubación. La cepa *M. canadense* no tiene la capacidad de hemoadsorber en el mismo tiempo de exposición y temperatura. Sin embargo es importante señalar que cepas patógenas como *M. mycoides subsp mycoides* no tienen la capacidad de hemoadsorber, y su patogenicidad no está mediada por la reacción positiva de la hemoadsorción.

La citoadsorción como mecanismo de patogenicidad, se observó en las colonias de micoplasmas en el medio sólido de *Mycoplasma spp* cepa en estudio, *M. bovis* y *M. canadense*, al permitir la adherencia de las células epiteliales de glándula mamaria. Los resultados indican una fuerte relación de las pruebas de hemoadsorción y citoadsorción del *Mycoplasma spp* cepa en estudio y de la cepa *M. bovis*, ya que esta última es considerada la especie más patógena para producir mastitis. Por otro lado, se sabe que no existe relación de estas dos pruebas con la cepa de *M. canadense*, la cual es capaz de unirse a la célula epitelial sin presentar un resultado positivo a la hemoadsorción, y que es considerado un microorganismo patógeno ya que produce mastitis en bovinos (Langford *et al* 1976).

Por la necesidad de tener un modelo confiable para evaluar la adhesión de organismos causantes de mastitis en células epiteliales de glándula mamaria, se procesaron glándulas mamarias de bovino para obtener células epiteliales y mantener cultivos de células que se utilizaron como sustrato para la adhesión

bacteriana. Esta metodología del cultivo de células, no es practicada por su dificultad en la obtención del cultivo celular primario. Generalmente se utilizan únicamente células epiteliales obtenidas por raspados del epitelio glandular y con ello se realizan infecciones bacterianas para obtener resultados de adherencia (Opdebeeck *et al* 1988). En las células epiteliales obtenidas en el cultivo celular primario de glándula mamaria se observó la íntima interacción de los micoplasmas, a los 30 minutos de infección, por medio de la microscopía electrónica de barrido, es indicativo de que los micoplasmas tienen la capacidad de adherirse en ese tiempo relativamente reducido.

Nuestros resultados indican que, *M. bovis* cepa Donnetta tuvo una alta capacidad de adherencia, le continuó *Mycoplasma spp* cepa en estudio y por último *M. canadense*, pero estadísticamente no hubo diferencia significativa en la adherencia entre los tres micoplasmas. La adherencia de los micoplasmas indica una importante interacción con las células epiteliales, indicio importante para desencadenar la colonización y patogenicidad bacteriana. Se determinó que a los 30 minutos el tiempo de adhesión para realizar todos los estudios, debido a que pasado el tiempo de 2 horas en adelante se observó desprendimiento de células, para poder establecer perfectamente el tiempo mínimo que tienen los micoplasmas de adherirse a las células epiteliales. Cuando se permitió la infección hasta las 24 horas de incubación, las células epiteliales se encontraban totalmente dañadas y desprendidas del cubreobjeto.

La adherencia observada es un indicio para inferir que los micoplasmas estudiados reconocen receptores de la célula huésped en la glándula mamaria del bovino. En estudios realizados con *M. mycoides subspecies mycoides* se observó alta adherencia del microorganismo a las células endoteliales de bovino, indicativo que reconoce receptores propios de la especie (Manchee y Taylor-Robinson 1968). Sin embargo es necesario obtener mayor información acerca de la naturaleza de los receptores así como de las citoadhesinas involucradas en la adherencia del *Mycoplasma spp* cepa en estudio, *M. bovis* y *M. canadense*. Como ocurre con estudios realizados con

M. pneumoniae, patógeno responsable del aparato respiratorio humano causante de la neumonía atípica, se le conoce la adhesina (P1) responsable de la adherencia y que tratada con tripsina se inhibe la adherencia al epitelio traqueal y a los eritrocitos (Hu *et al* 1977 ; Gorshy y Bredt 1977).

La adherencia de *Escherichia coli*, a los 30 minutos de infección, indica la alta interacción que tiene este microorganismo con las células epiteliales, a diferencia con *Staphylococcus aureus* que presentó poca adherencia. Hay informes de microorganismos que no tienen la capacidad de adherirse pero que tienen alta actividad citotóxica. La adherencia y la citotóxicidad son dos mecanismos diferentes que pueden o no estar relacionados. En el caso de *Staphylococcus aureus* con baja adherencia, se le han encontrado factores como: la presencia de un polisacárido capsular que interfiere con la adhesión, la utilización de cepas de *S. aureus* que se aislaron de casos clínicos, otitis, piodermas, no asociados a la mastitis y no son considerados patógenas de la glándula mamaria, la utilización del suero fetal bovino para el mantenimiento de las células epiteliales cultivadas que pueden bloquear receptores de superficie que son responsables de la adherencia bacteriana (Ogawa *et al* 1985, Vann *et al* 1987).

En la microscopía electrónica de transmisión las cepas de micoplasmas estudiadas se observaron adheridas a la membrana de las células epiteliales de glándula mamaria. El *Mycoplasma spp* cepa en estudio presentó una estructura, como un puente, que permitía la unión a la célula epitelial. *M. pneumoniae* presenta una estructura terminal especializada denominada "tips" que tiene la función de la motilidad del micoplasma para atravesar el moco que cubre el epitelio y permitir la adherencia del microorganismo al epitelio traqueal (Collier 1980). Las cepas de *M. pneumoniae* que pierden la proteína P30 por una mutación se les considera defectuosa, presentan estas Tips con características no definidas (Romero *et al* 1997). Estudios de adherencia realizados con *M. pulmonis* en células de traquea de ratas se observó al micoplasma asociado a la membrana, pero no se observó fusión. (Stadtlander *et al* 1991) Los micoplasmas estudiados no presentaron esa

característica propia de algunos micoplasmas de invaginarse en la membrana de la célula huésped, característica que presenta *M. pneumoniae* con el fin de evadir la fagocitosis por macrófagos alveolares, como se ha demostrado en estudios realizados en enfermedades en humanos en forma natural. Es difícil observar esta característica con el *Mycoplasma spp* ya que a las dos horas de incubación se observaba el desprendimiento de las células. Posiblemente sea necesario, como ocurre con *M. pneumoniae*, que sólo se llega a observar esta situación en casos *in vivo* (Collier 1980).

En la cepa de *E. coli* se sugiere que se observó adherida a la célula epitelial por medio de su fimbria a los 30 minutos de incubación, en un cultivo de caldo nutritivo, con 24 horas de incubación. Si el ensayo se hubiera realizado en el medio de cultivo para promover más síntesis de pili y un crecimiento de *E. coli* en su fase log, posiblemente se hubiera observado mayor adhesión y más daño. La expresión del pili es el factor de adhesión importante de *E. coli*. Las cargas y propiedades hidrofóbicas de las superficies bacterianas responsables de la adhesión y las condiciones del cultivo inducen la producción de pili e incrementan las condiciones hidrofóbicas (Smyth *et al* 1978) y para permitir una adhesión específica (Jones y Rutter 1972; Tramont y Boslego 1985). Estudios realizados con *E. coli* K 88 (F4) y su virulencia en la glándula mamaria de ratones y bovinos, indicaron que la cepa de *E. coli* no se adhiere al epitelio de la glándula mamaria de ratón, debido posiblemente a que la cepa de *E. coli* K 88 (F4), patógena que solo afecta el aparato digestivo de cerdos. Sin embargo hay controversias sobre la adhesión bacteriana en el establecimiento de la mastitis ya que no hay evidencias de que la adherencia *E. coli* sea responsable en la patogénesis de la mastitis bovina (Anderson *et al* 1977).

En las células infectadas con las cepas de *E. coli* y micoplasmas, se observó que los dos microorganismos estaban adheridos a la membrana celular, pero en menor proporción se encontró a la *E. coli* cuando esta cepa estaba infectando sola a la célula epitelial. Posiblemente esta baja de la adherencia de *E. coli* con respecto a los

micoplasmas es que comparten los mismos receptores, ya que las cepas en el momento de la infección se depositaban al mismo tiempo. Se sabe que en la hemoadsorción de los micoplasmas con los eritrocitos de cuy y de bovino, los primeros reconocen receptores de ácido siálico (Manchee y Taylor-Robinson 1968) y posiblemente la cepa de *E. coli*, aislada de un caso clínico de mastitis aguda, reconoce el mismo receptor. Es necesario realizar más estudios de los receptores y citoadhesinas que tienen los micoplasmas y *E. coli* para interactuar con las células. Así mismo se observó que en la cepa de *E. coli* se encontraban micoplasmas adheridos a su pared celular, evento que se observó en estudios realizados con diferentes bacterias que mostraron diferente adherencia en colonias de micoplasmas, este fundamento sugiere la coexistencia o la asociación de los micoplasmas con otras bacterias para comprender mejor la distribución de los micoplasmas en humanos y animales (Timenetsky J 1997).

Al no encontrarse evidencias de la enzima deshidrogenasa láctica a los 30 minutos de infección se puede inferir que se requiere de mayor tiempo de infección para poder detectarla y que nos indique la posible alteración de la membrana. Estudios con *M. pulmonis* para evaluar efectos citopáticos *in vivo* e *in vitro* en ratas inoculadas y en células de traquea cultivadas se observó cilioestasis y potente efecto citopático en ambos ensayos (Stadtlander *et al* 1991).

Sin embargo (Méndez *et al* 1999) observaron que después de las dos horas de infección en adelante, 2, 6, 8, 12, 18 y 24 horas, se cuantificó la liberación de la enzima deshidrogenasa láctica, alcanzando su pico a las 12 a 15 horas, que sugiere alteración de la membrana de la célula epitelial indicativo de daño celular. Es importante señalar que el micoplasma después de producir daño fue capaz de aislarse, por ello, se puede decir que este se adhiere y debe estar metabólicamente activo para ocasionar daño.

Estos resultados coinciden con lo observado en la adherencia, en los estudios de microscopía electrónica de transmisión, que a partir de las 2 horas en adelante, se observó pérdida de integridad de la membrana que se interpreta como daño en las

células epiteliales, aumentando el tiempo de incubación las células se encontraban dañadas y desprendidas del cubreobjeto. Los resultados presentados sugieren que hay interacción de los micoplasmas a los 30 minutos a 37 C de infección a la célula epitelial, la no liberación de la enzima deshidrogenasa láctica en el mismo tiempo de infección indican que no existe daño cuantificado por los reactivos estandarizados de daño celular. Se encontró mayor liberación de la enzima en las células infectadas por *Mycoplasma* spp cepa en estudio, posteriormente *M. bovis* y al último *M. canadense*. La diferencia en los rangos de la actividad enzimática obtenida de tejido normal y dañado es muy importante para establecer la actividad de los micoplasmas en las células. La determinación de la actividad enzimática en la práctica clínica se ha utilizado desde la década de los treinta para realizar un diagnóstico confiable y definitivo, esta metodología a sido utilizada únicamente para determinar daño celular mediada por hormonas, insuficiencias, no para microorganismos (Wang 1977, Garvie 1980, Legrand *et al* 1992). Se deben realizar mas estudios para establecer cual es el mecanismo por el cual se lleva a cabo el daño celular del *Mycoplasma* spp después de la adherencia. Se concluye que el *Mycoplasma* spp cepa en estudio es capaz de adherirse a células epiteliales de glándula mamaria de bovino a los 30 minutos de infección, se sugiere que puede reconocer receptores propios de la célula huésped, situación similar que se observó en estudios realizados con *M. mycoides subsp mycoides* en cultivos de células endoteliales (Valdivieso *et al* 1989), al producir alteración a la membrana celular observado en la microscopía electrónica de transmisión y por la presencia de la deshidrogenasa láctica a partir de las dos horas de infección, es así que se infiere que el *Mycoplasma* spp con actividad proteolítica esta asociado a problemas de mastitis de bovinos, con base a los resultados obtenidos es posible hipotetizar que esta cepa pueda ser el agente etiológico primario de la glándula mamaria de bovino capaz de producir mastitis.

Mycoplasma spp cepa en estudio fermenta la glucosa lo cual ocasiona que el pH del medio sea ácido, las cepas control de *M. bovis* y *M. canadense* que son

negativas a estas reacción, pero que hidrolizan a la arginina provocan la deficiencia del aminoácido esencial arginina , se puede atribuir que posiblemente estos dos factores pueden ser los responsables del daño celular o que interfieran con el metabolismo de las células epiteliales de glándula mamaria, sin embargo es importante realizar más estudios de los mecanismos de virulencia de esta cepa, como la presencia de toxinas, liberación de productos metabólicos y la inoculación *in vivo* del microorganismo en glándulas mamarias de bovino.

LITERATURA CITADA

1. Anderson JC, Howard CJ, Gourlay RN. A comparative study of virulence of bovine mastitis and fecal *E. coli* in animals: occurrence and pathogenicity mechanisms: a review. *Infect. Immun.* 1977; 13:1205-1208.
2. Barber TL. Mycoplasma and bovine mastitis. Laboratory diagnosis of mycoplasmosis in food animals. *Amer. Assn. Vet. Lab. Diag.* 1976; 46-51.
3. Behrens A, Heller M, Rosenbusch R, Kirchhoff H. Immunoelectron microscopic localization of variable proteins on the surface of *Mycoplasma bovis*. *Microbiology* 1996; 142 (7):1863-1871.
4. Bennett RH, Jasper DE. Bovine Mycoplasmal mastitis. *Cornell Vet* 1977; 67:361-373.
5. Boatman ES. Morphology and ultrastructure of the mycoplasmatales In: *The Mycoplasma*. Barile MF, Razin S. vol 1. New York: Academic Press 1979: 63-102.
6. Carter RG. 1989. *Fundamentos de bacteriología y micología veterinaria*. España. Ed. Acribia. 260.
7. Clyde WA Jr. Antigenic determinants of the attachment protein of *Mycoplasma pneumoniae* shared by other pathogenic *Mycoplasma* species. *Science* 1983; 139:55.
8. Collier MA. Attachment of *Mycoplasma pneumoniae* to respiratory epithelium. In *Bacterial adherence* Edited by Beachey E.H. Series B, Vol. 6, London and New York. Chapman and Hall. 1980: 159-183.
9. Dellinger JD. Characterization studies on mycoplasmas isolated from bovine mastitis and the bovine respiratory tract. *Cornell Vet* 1977; 67:352-357.
10. Dybvig K y Voelker LL. Molecular biology of mycoplasmas. *Annu. Rev. Microbiol.* 1996; 50:25-57.

11. Gardella S.R., Delgiudice, R.A. and Tully, G.J.: Immunofluorescence. *Methods in Mycoplasmaology*. Vol. 1, Academic Press, New York. 1983 :431-440.
12. Garvic EL. Bacterial Lactate dehydrogenases. *Microbiol Rev* 1980 ; 44 :106-139.
13. Gobe MF. Studies on the adherence mechanism of *Mycoplasma pneumoniae* FEMS Microbiol 1981 , 1 : 265-267.
14. Gorshy F and Bredt W. Studies on the adherence mechanism of *Mycoplasma pneumoniae*. FEMS Microbiol. Lett 1977 ; 1 : 265-267.
15. Gourlay, RN, Howard, CN. : Bovine mycoplasmas. In : Tully , JG, Whitcomb, RF. The Mycoplasmas . vol. II : Human and animal Mycoplasmas. Acad. Press. New York. 1979 : 49-102.
16. Gyles CL, Thoen CO. Pathogenesis of bacterial infections in animals. Iowa State University Press Ames USA, 1993.
17. Hale HH, Helmboldt CF, Plastridge WN. Inflammatory toxin from *Mycoplasma bovis* : Isolation and characterization. *Res. Vet. Sci.* 1962 ; 5 : 303-309.
18. Hartman HH, Tourtellotte ME, Nielsen SW, Plastridge WN. *Res. Vet. Sci.* 1964 ; 5 : 303-309.
19. Hjerpe CA, Knight HD. Polyarthritis and synovitis associated with *Mycoplasma bovimastitidis* in feedlot cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1972 ; 160: 1414-1418.
20. Hu PC, Collier AM, Baseman JB. Surface parasitism by *Mycoplasma pneumoniae* of respiratory epithelium. *J. Exp. Med.* 1977 ; 145 : 1328-1343.
21. Jasper DE. Pathogenesis of bovine mycoplasma mastitis. *J. Am. Vet. Met Assoc.* 1977 ; 170 : 1167-1172.
22. Jasper DE. Bovine mycoplasmal mastitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1979 ;75 : 1072-1074.
23. Jones GW, Rutter JM. Role of the K88 antigen in the pathogenesis of neonatal diarrhea caused by *Escherichia coli* in piglets. *Infect. Immun.* 1972 ; 6 : 918-927.
24. Kehoe JM, Norcross NL, Carmichel LE, Strandberg JD. Isolation, propagation and characterization of an ovine Mycoplasma responsible for proliferative interstitial pneumoniae. *J. Infect. Dis.* 1967; 17: 171-179.

25. Kirk JH, Boughton E .1997. *Mycoplasma bovis mastitidis* Vet Bull 1997 ; 49: 377-387.
26. Krause DC and Taylor-Robbinson A. Identification *Mycoplasma pneumoniae* proteins associated with hemadsorption and virulence. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1992; 112 : 905-909.
27. Langford EV, Runken HL. Onoviran O. *Mycoplasma canadense*, a new bovine species. Int J. System Bact 1976 ; 26 : 212-219.
28. Legrand C, Bour JM, Jacob C, Capiaumont J, Martial A, Marc A, *et al* Lactate dehydrogenase LDH activity of the number of dead cells in the medium of cultured eukariotes cells as marker. B. Bacteriol. 1992 ; 25 : 231-243.
29. Manchee RJ, Taylor-Robbinson, D. Haemadsorption and haemagglutination by mycoplasmas. J. Gen. Microbiol. 1968 ; 50 : 465-478.
30. Méndez OE, Miranda MRE, Trigo TF, Suárez GF. El uso de la lactato deshidrogenasa como indicador de daño celular *in vitro* causado por micoplasmas en células epiteliales. Enfermedades infecciosas y microbiología 1999 ; 19 p 57. XXIV Congreso de Infectología y antimicrobianos. Morelia, Michoacan junio de 1999.
31. Meng KE and Pfiser RM. Intracellular structures of *Mycoplasma pneumoniae* revealed after membrane removal. J. Bacteriol. 1980 ; 114: 390-399.
32. Ofek I, Beachey R. General concepts and principles of bacterial adherence in animals and man. In: Bacterial adherence Edit by Beachey E.H. Series B, Vol. 6, London and New York . Chapman and Hall . 1980 :1-29.
33. Ogawa SK., Yurbeg ER, Hatcher VB., Levit MA., Lowy FD. : Bacterial adherence to human endothelial cells *in vitro*. Infect. Immun. 1985; 50 : 218-224.
34. Opdebeeck, J.P., Frost, A.J. and Oboyle, D.: Adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to bovine udder epithelial cells. Vet. Microbiol 1988 ; 16: 44-86.
35. Phillips D.M.: SEM for detection of mycoplasma contamination of cell cultures. Scan. Elect. Microsc. USA, 1978.

36. Razin S y Jacobs E. *Mycoplasma Adhesion*. *J. Gener. Microbiol.* 1992 ; 138 :407-422.
37. Razin S: *Mycoplasma adherence* . In: Razin, S, and M.F. Barile (eds) . *Mycoplasma pathogenicity*, Vol. IV. Acad. Press Orlando 1985 ;161-200.
38. Romero CE, James SR, Farmer M y Krause DC. Does loss of the putative cytoadherence protein P30 confer a developmental defect in *Mycoplasma pneumoniae*. 1997. 97 th General Meeting. Miami Florida . p 282.
39. Ruhnke HL, Thawley D, Nelson FC. *Mycoplasma canadense* , a new bovine species. *Can. J. Comp. Med* 1976 ; 40 : 142-148.
40. Sachse K, Grajetzki C, Rosengarten R, Hanel I, Heller M, Pflutzner H. Mechanisms and factors involved in *Mycoplasma bovis* adhesion to host cells. *Zentralbl Bakteriol* 1996 ; 284 (1) : 80-92.
41. Sastrowidjojo S y Frost, A.J. Cell cultures derived from bovine mammary ductular epithelium for the investigation of mastitis. *J. Aust. Vet.* 1986 ; 63: 194.
42. Seviour R.J., Pethica, L.M. and McClure, S. A simple modified procedure for preparing microbial cells for scanning electron microscopy. *J. Microbiol. Methodol.* 1984 ; 3: 1-5.
43. Smyth CJ, Jonson P, Olsson E, Soderlind O, *et al* . Differences in hydrophobic surface characteristics of porcine enteropathogenic *Escherichia coli* with or without K 88 antigen as revealed by hydrophobic interaction chromatography. *Infect. Immun* 1978 ; 22 : 462-472.
44. Stadtlander CT, Watson JW, Simecka JW y Cassell GH. Citopathic effects of *Mycoplasma pulmonis* In vivo and In vitro. *Infect Immun.* 1991 ; 59 (11) : 4201-4211.
45. Stalhein OHV, Proctor S. Mycoplasmal respiratory diseases of ruminants : a review and update. *J. Am. J. Vet. Res.* 1976 ; 37 :879-883.
46. Timenetsky J. Rods and cocci adherence on *Mycoplasma* colonies. 1997. 97 th General Meeting. Miami Florida . p 284.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

47. Tramont EC, Boslego JW. Pilus vaccines. *Vaccine*. 1985 ; 3 : 3-10.
48. Valdivieso GA, Soren R y Shelley S. Adherence of *Mycoplasma mycoides subspecies mycoides* to cultured endothelial cells. *Zbl. Bakt.* 1989 ; 272 : 210-215.
49. Vann JM., Proctor RA. : Ingestion of *Staphylococcus aureus* by bovine endothelial cells results in time- and inoculum- dependent damage to endothelial cell monolayers. *Infect. Immun* 1987 ; 55 : 2155-2163.
50. Wang XC, Jiang L, Zhouhm . Minimal funtional unit of lactates deshydrogenase. *J. protein chem* 1977 ; 16 (3) : 227-231.
51. Whitford, H.W. Rosenbusch, R.F. *Mycoplasmosis in animals: Laboratory Diagnosis*. Iowa State Univ. Press. New York. 1994.

APÉNDICE

SUBAPÉNDICE 1

MEDIO DE HAYFLICK.

Medio base :

Caldo PPLO	21 g
Agua destilada, deionizada	1000 ml
Rojo de fenol solución al 1%	2 ml

Ajustar pH a 7.4

Esterilizar por autoclave 121°C 15 min

Complemento del medio base.

Medio base	75 ml
Suero de equino inactivado	20 ml
Acetato de talio solución al 10 %	2 ml
Glucosa solución al 10%	1 ml
Extracto de levadura fresco	10 ml
Penicilina 100000 UI/ml	1 ml

Medio sólido :

Medio base	100 ml
ión Agar # 2 purificado	0.8%

Combinados todos los ingredientes, el medio líquido se envasa en alícuotas de 2 ml y se conserva en congelación a -20°C hasta su uso. Las cajas de agar (medio sólido), se preparan con Ion Agar No 2 que es un agar puro y no es tóxico para los micoplasmas, el medio sólido lleva una concentración de agar de 0.8 % en agua deionizada y se esteriliza a 15 libras, 121°C por 15 minutos.

SUBAPÉNDICE 2

INHIBICIÓN DEL METABOLISMO

De un cultivo de 24 horas de micoplasma se preparan alícuotas de 0.5 ml y se conserva en congelación a -70°C . Una de las alícuotas se descongela y se diluye logarítmica hasta la 10^{-12} . De cada dilución se toma 0.05 ml y se deposita en cada uno de los pozos de una microplaca de 96 pozos, posteriormente se agrega 0.15 ml de medio de cultivo Hayflick para obtener un volumen final de 0.2 ml., la placa se sella con cinta adhesiva y se incuba a 37°C hasta que se observe cambios de pH de los controles.

Una Unidad de Cambio de color (UCC) en 0.05 ml está contenida en la mayor dilución que presenta cambio de color.

SUBAPÉNDICE 3

INHIBICION DEL CRECIMIENTO

Medio de cultivo de Hayflick en sólido.

Discos de papel filtro estériles impregnados con 0.025 de antisuero contra de micoplasma.

El suero se puede aplicar a los discos inmediatamente antes de usarse o bien se pueden dejar secar y guardar a 4 °C ó -20 C.

Cultivo de micoplasmas en cultivo puro por clonación triple y filtrado, utilizar un inculo de 1×10^4 ó 1×10^5 unidades formadoras de colonias UFC / ml.

Las placas se siembran por gota suspendida, se deja secar y se deposita el disco con el antisuero y se incuba a 37 C.

Una zona de inhibición de 5 mm alrededor del disco, la cepa en estudio es considerada homologa al antisuero.

SUBAPÉNDICE 4

INMUNOFUORESCENCIA INDIRECTA EN COLONIAS

Los microorganismos se desarrollan en el medio sólido de Hayflick y se incuban a 37 C por 3 días para observar colonias de micoplasmas perfectamente aisladas.

- Lavar las colonias con SAF 7.2 dejar por 30 minutos a temperatura ambiente.
- Decantar el SAF
- Agregar 0.05 ml conteniendo 4-8 unidades fluorescentes para cada conjugado de micoplasma específico de especie.
- Incubar las placas a 37 C en un ambiente húmedo por 30 minutos.
- Descarta el conjugado.
- Lavar por tres veces la superficie de agar con SAF pH 7.2.
- Se voltean las cajas para que se sequen y se observa con un microscopio fluorescencia

SUBAPÉNDICE 5

CULTIVO CÉLULAR PRIMARIO DE GLÁNDULA MAMARIA

METODOLOGÍA DE SASTROJOJO 1986.

La glándula sana, se obtiene de bovinos de rastro, se disecciona y se corta en pedacitos pequeños el tejido epitelial de los senos láctíferos, las piezas se colocan en alcohol y posteriormente se lavan con SAF pH 7.2 (sol. amortiguadora de fosfatos) que contiene penicilina 1000 unidades /1 ml y estreptomycinina 200 g / ml.

- La SAF se decanta y reemplaza por una sol. de tripsina al 0.2%, EDTA al 0.02 y la tripsina se decanta y se pone en hielo para detener su efecto.
- La tripsina se centrifuga a 2,000 ó 3,000 r.p.m. /5 min.
- El botón de células se lava con SAF pH 7.2 por dos ocasiones y en el último lavado se filtran con una gasa estéril.
- La suspensión de células se deposita en el medio 199 Hepes suplementado con el 7% de suero fetal bovino y se incuba a 37 C con 10% de CO₂ se examina regularmente, por 5 a 10 días, posteriormente se les quita el medio de cultivo y se les agrega más medio fresco, se observan células planas pegadas al cristal y se observa grumos de células flotando.

SUBAPÉNDICE 6

DESHIDROGENASA LÁCTICA

Procedimiento para las células adherentes.

- Después de lavar a las células en el medio base, diluir a la concentración determinada para el experimento 2×10^6 células por mililitro, como lo indica este ensayo.

- Añadir 100ml de la suspensión de células a cada pozo del plato de cultivo celular con 96 pozos. No se deben agregar células a los pozos controles.
- Incubar las células toda la noche a 37 C, 5% CO₂ y 90% de humedad, para permitir que las células se adhieran.
- Titular con diluciones la sustancia testigo micoplasmas, hacerlo con el medio adecuado y por separado en un placa (volumen final de 100 ml/pozo 1 x 10⁴ micoplasmas).
- Remover el medio de cultivo de las células adheridas (para liberar la actividad de la LDH de las células que se mantuvieron incubando toda la noche) y añadir 100 ml de medio de cultivo e fresco a cada pozo.
- Transferir 100ml de las diluciones de la sustancia testigo a cada pozo que contiene las células adheridas.
- Determinar el control blanco: Llenar pozos por triplicado con 200ml del SAF.
- Determinar el control de baja concentración: Añadir 100 ml de SAF pH 7,4 a los pozos por triplicado que contiene 100ml/pozo de células.
- Determinar el control de alta concentración: Añadir 100 ml / pozo de la suspensión de células por triplicado se le agregó 100 ml / pozo de la solución Triton X-100.
- Determinar la sustancia testigo problema : Añadir 100 ml / pozo de la sustancia testigo a los pozos que contienen 100 ml / con SAF pH 7.4 por triplicado.
- Incubar las células a 37 C, 5% CO₂ , y 90% de humedad. El tiempo de incubación varía ya que va de 2 a 24 hrs.
- Centrifugar la placa de 96 pozos a 1400 r.p.m. por 15 minutos.
- Remover 100 ml / pozo del sobrenadante, con mucho cuidado de no alterar el sedimento, y transferir al pozo correspondiente a otra placa de 96 pozos con fondo plano.

- Para determinar la actividad de la LDH en este sobrenadante, añadir 100ml de la reacción mezcla a cada pozo e incubar por 30 min. A temperatura ambiente. Durante esta incubación la placa debe protegerse de la luz.
- Medir la absorbancia de las muestras a 490 o 492 nm , de acuerdo a los filtros usados en el lector ELISA. Como referencia la longitud de onda debe ser mayor que 600 nm.

CONTROLES :

Para calcular el porcentaje de daño, se tienen que hacer los tres métodos de control para cada experimento.

- 1.- Control Blanco: Proporciona información acerca de la actividad del LDH contenida en el medio. El valor de adsorbancia obtenido en este control tiene que restarse a los demás valores.
- 2.- Control de concentración baja: Proporciona información acerca de la actividad liberada de LDH en células normales no tratadas (igual a la liberación espontánea de LDH).
- 3.- Control de concentración alta : Proporciona información acerca de la máxima liberación de la actividad de LDH en las células (igual a la máxima liberación de LDH).

CÁLCULO :

Para determinar el porcentaje de daño, se calcula el promedio de los valores de absorbancia del triplicado y se resta a cada una el valor de absorbancia obtenido en el control blanco.

Valor experimental - Control bajo

$$\text{Daño (\%)} = \frac{\text{Control alto} - \text{Control bajo}}{\text{Control alto} - \text{Control bajo}} \times 100$$

METODOLOGÍA ANTES DE LA INFECCION.

- Solución Triton X-100 (Triton X-100 al 2% en el medio base).

La máxima cantidad liberada de la enzima LDH es determinada por las células lisadas con el Triton X-100 (concentración final de Triton X-100 al 1%, con ésta concentración el Triton no afecta la actividad de LDH).

La liberación de la actividad de LDH se calcula en porcentaje de citotoxicidad relativa o absorbancia.

REACTIVOS DE LA PRUEBA.

Reactivo A : Deaformazan NAD⁺, (Catalizador). Se agrega 1 ml de agua destilada y se mezcla por 10 min, es estable por 4 semanas en 4 C.

Reactivo B : Cloruro de iodo tetrazolio mezclado con lactato de sodio (45 ml), es estable en 4 C.

Para 100 pruebas se agrega 200 ml del reactivo A para 11.25 ml de reactivo B.