

01674
18



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE *Mycoplasma spp*
EN *Raillietia caprae* (Acari Mesostigmata Raillietidae).

295944

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE LA
MAESTRIA EN CIENCIAS
DE LA PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL

P R E S E N T A :

JUANA JIMENA **OTERO NEGRETE**

COMITE TUTORAL:

MA. TERESA QUINTERO MARTINEZ

VICTOR VAZQUEZ PRATTS

TONATIUH CRUZ SANCHEZ



MEXICO, D. F.

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DEDICATORIA

A mi mamá Rosa Ma. Negrete García y mi papá Luis Otero Nova, quienes me han mostrado su cariño y apoyo en todo momento.

A mi abuelita Rosa García, a mi tía Juana Lourdes Negrete, quienes siguen estando en mi mente y corazón.

A Héctor quien me ha enseñado lo maravilloso, importante y necesario que es el amor en este mundo.

A mis mascotas Chiquita, Negro y Peque, con quienes he podido compartir momentos muy agradables y otras mascotas que me inspiraron a querer estudiar la carrera de Médico Veterinario Zootecnista la cual no cambiaría por ninguna otra.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ma. Teresa Quintero Martínez por apoyarme y guiarme en el área de la parasitología, por darme la oportunidad de conocer otros lugares, otras gentes y otros tipos de vida, por enseñarme a valorar más mi país.

A la Dra. Laura Jaramillo Meza por ayudarme y apoyarme en la realización de este proyecto y que sin su ayuda tal vez no se hubieran logrado los resultados deseados.

A mi H. jurado Drs. Víctor Vázquez Prats, Tonatiuh Cruz Sánchez y Zeferino García Vázquez por su ayuda y observaciones para la realización de esta tesis.

Al Dr. Jaime Navarro, quien siempre me ha ayudado en materia de estadística.

Al CENID-Microbiología y todos sus miembros.

A CONACYT y a DGEF por el apoyo que recibí mediante las becas que me proporcionaron.

A Alain Lewis por permitirme sangrar a su mejor caballo para obtener uno de los elementos que necesitan los micoplasmas para crecer.

RESUMEN

El género *Mycoplasma* se asocia con diversas enfermedades que afectan a las cabras, tales como: la pleuroneumonía contagiosa caprina, agalactia contagiosa, queratoconjuntivitis, neumonías y poliartritis son enfermedades multifactoriales y en la mayoría de los casos de curso crónico, además de difícil diagnóstico. Como habitantes de humanos y animales, se encuentran principalmente en las mucosas como: conjuntivas, cavidad nasal, faringe, laringe, mucosa intestinal, genitales y oídos. Investigaciones realizadas en otros países señalan que los ácaros como *Raillietia caprae* que están presentes en el conducto auditivo de las cabras pueden ser vectores de micoplasmas patógenos para esta especie animal, pues se han recuperado micoplasmas en algunas ocasiones, después de que se ha presentado un brote de micoplasmosis. Sin embargo, estos microorganismos, también se han recuperado de ácaros obtenidos de cabras aparentemente sanas. El objetivo de este trabajo fue determinar si existe una asociación particular de bacterias del género *Mycoplasma* con el ácaro *Raillietia caprae* presente en el oído interno de las cabras. Para lo cual se realizó la prueba de Ji² y el resultado obtenido mostró que si hay asociación entre la presencia del ácaro y la presencia de los micoplasmas, con una P=0.0001. Para lo cual se obtuvieron muestras del cerumen mediante hisopos, de los conductos auditivos de animales sacrificados en rastro. Las muestras se revisaron para determinar la presencia del ácaro *Raillietia caprae*; macerados de los ácaros fueron inoculados en medio apropiado para el cultivo de micoplasmas al igual que las muestras del cerumen. Se obtuvo un total de 34 aislamientos de micoplasmas que fueron identificados mediante pruebas bioquímicas y por serología. Las especies aisladas de los ácaros *R. caprae* presentes en el conducto auditivo de las cabras analizadas fueron: *M. conjuntivae*, *M. putrefaciens*, *M. adleri*, *M. cottewii* y *M. yeatsii* estas tres últimas son especies que hasta el momento se desconoce su potencial patógeno.

Palabras claves: *Mycoplasma*, *caprae*, ácaros.

CONTENIDO

	PAGINA
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I	4
LOS MICOPLASMAS	4
1.Características de los Micoplasmas	4
2.Habitat	9
3.Patogenicidad	9
4.Especies de Micoplasmas asociados con procesos infecciosos en las cabras	11
4.1Especies de micoplasmas aisladas de cabras	12
<i>Mycoplasma agalactiae</i>	12
<i>Mycoplasma arginini</i>	12
<i>Mycoplasma capricolum</i>	12
<i>Mycoplasma conjunctivae</i>	12
<i>Mycoplasma spp. F38</i>	13
<i>Mycoplasma mycoides subespecie capri</i>	13
<i>Mycoplasma mycoides subespecie mycoides LC</i>	13
<i>Mycoplasma mycoides subespecie mycoides SC</i>	14
<i>Mycoplasma ovipneumoniae</i>	14
<i>Mycoplasma putrefaciens</i>	14
<i>Mycoplasma adleri</i>	14
4.2Características bioquímicas de las especies de Micoplasmas	15
<i>Mycoplasma mycoides var mycoides</i>	15
<i>Mycoplasma capricolum</i>	15
<i>Mycoplasma agalactiae</i>	15

<i>Mycoplasma ovipneumoniae</i>	16
<i>Mycoplasma arginini</i>	16
<i>Mycoplasma auris</i>	16
<i>Mycoplasma cottewii</i>	16
<i>Mycoplasma yeatsii</i>	17
<i>Mycoplasma adleri</i>	17
5.Pruebas serológicas: Inhibición de crecimiento e inhibición metabólica para serotipificar especies de Micoplasmas	19
CAPITULO II	20
Los ácaros	20
1. <i>Raillietia caprae</i>	21
CAPITULO III	26
Acaros y Micoplasmas	26
OBJETIVOS	30
HIPÓTESIS	30
CAPITULO IV	31
MATERIAL Y METODOS	31
1.Localización de los animales	31
2.Tamaño de la muestra	31
3.Toma de las muestras, tanto para aislar micoplasmas como para identificar los ácaros	31
4.Procesamiento de la muestra	32
4.1 Medio de cultivo	32
4.2 Identificación, lavado y trituración de los ácaros	32
4.3 Diluciones e incubación del medio de cultivo	32
4.4 Identificación mediante pruebas bioquímicas y métodos serológicos	33
4.4.1 Pruebas bioquímicas	33
4.4.1.1 Prueba de dependencia de esteroides	33

4.4.1.2 Películas y manchas	33
4.4.1.3 Hidrólisis de la caseína	34
4.4.1.4 Reducción de tetrazolio	34
4.4.1.5 Fermentación de carbohidratos	34
4.4.1.6 Prueba de hidrólisis de aminoácidos	34
4.4.2 Pruebas serológicas	35
4.4.2.1 INHIBICION DE CRECIMIENTO	35
4.4.2.2 INHIBICION METABÓLICA	36
5. Análisis electroforético de los diferentes aislamientos de micoplasma	36
CAPITULO V	38
RESULTADOS	38
1. AISLAMIENTOS DE MICOPLASMAS	38
2. PORCENTAJES DE AISLAMIENTOS DE MICOPLASMAS EN MACERADOS, LAVADOS Y DE HISOPOS CON CERUMEN	38
3. PRUEBAS BIOQUÍMICAS	39
4. PRUEBAS SEROLOGICAS	39
5. ESPECIES DE MICOPLASMAS QUE SE ENCONTRARON EN CABRAS CON ACAROS	39
6. ESPECIES DE MICOPLASMAS QUE SE ENCONTRARON EN CABRAS SIN ACAROS	40
7. ANÁLISIS ELECTROFORETICO	40
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	42
CAPITULO VI	50
Discusión	50
CAPITULO VII	55
CONCLUSIONES	55
COMENTARIOS	56

BIBLIOGRAFÍA	57
APÉNDICE	62

LISTA DE CUADROS

PAGINA

CAPITULO I

CUADRO 1 Características y taxonomía de la clase <i>Mollicutes</i>	5
CUADRO 2 Propiedades que distinguen a los <i>Mollicutes</i> de otras eubacterias	7
CUADRO 3 Bioquímicas de las diferentes especies de Mycoplasmas que se presentan en cabras	18
CAPITULO V	
CUADRO 4 Resultados de las pruebas bioquímicas de Aislamientos de micoplasmas obtenidos de cabras sin Ácaros	43
CUADRO 5 Resultados de las pruebas bioquímicas de los Aislamientos de micoplasmas obtenidos de cabras con Ácaros	43
CUADRO 6 Pruebas bioquímicas practicadas a los diferentes Aislamientos de micoplasmas identificados serológicamente	44
CUADRO 7 Frecuencia de aislamientos de micoplasmas en macerados de <i>Raillietia caprae</i>	45
CUADRO 8 Frecuencia de aislamientos de micoplasmas Recuperados del lavado de los ácaros <i>Raillietia caprae</i>	45
CUADRO 9 Frecuencia de aislamientos de micoplasmas Recuperados del cerumen de cabras positivas a <i>Raillietia caprae</i>	45

CUADRO 10 Frecuencia de aislamientos de micoplasmas Recuperados del cerumen de cabras negativas a <i>R. caprae</i>	46
CUADRO 11 Frecuencias de aislamiento de las diferentes especies de micoplasmas en base al origen del aislamiento en cabras positivas a <i>R. caprae</i>	46

LISTA DE FIGURAS

PAGINA

CAPITULO I

FIGURA 1 Colonias de micoplasmas 8

CAPITULO II

FIGURA 2 Esquemas a y b de *Raillietia caprae* 23

FIGURA 3 Esquemas de los quelíceros de *R. caprae* 24

FIGURA 4 Especimen de *Raillietia caprae* 25

CAPITULO V

FIGURA 5 Bandas de electroforesis 47

FIGURA 6 Bandas de electroforesis 47

FIGURA 7 Foto de la prueba de inhibición
metabólica 48

FIGURA 8 Prueba de inhibición de crecimiento 49

INTRODUCCION

Existen más de 60 razas de cabras reconocidas en el mundo. Todas son animales de las cuales se puede obtener leche, carne, fibras, pieles e incluso compañía como mascotas.

Son varias las razones de la popularidad de las cabras; por ejemplo su adquisición es relativamente económica, es un animal que se reproduce con eficiencia, no necesita alojamientos especiales, son ramoneadores más que pastadores, gracias a su temperamento que son curiosas no huyen del hombre, por su tamaño es posible criarlas en muy poco terreno y hay que borrarse la idea de que las cabras son animales de gente subdesarrollada, o para aficionados ya que por ejemplo existen empresas lecheras económicamente fuertes en E.U. y Europa que trabajan con razas lecheras como: Toggenburg, Saanen, Alpina francesa, Nubia y La Mancha.(1)

Debido a la facilidad del animal para adaptarse aún en condiciones desfavorables para su desarrollo y a su carácter independiente, los propietarios en general no le ponen mucha atención cuando el animal llega a enfermarse ni a la causa que la origina. Las enfermedades en cabras como en cualquier otro ser vivo puede ser por distintos agentes etiológicos tales como: virales, bacterianos, hongos o parásitos; y dentro de las enfermedades comúnmente estudiadas que pueden presentarse en las cabras se encuentran: el complejo respiratorio, neumonías, la artritis encefalitis caprina, brucelosis, queratoconjuntivitis, la agalactia contagiosa, pododermatitis infecciosa, miasis, parasitosis pulmonares y gástricas y finalmente ectoparasitosis (2, 3).

Varias de las enfermedades de origen bacteriano son producidas por micoplasmas, los cuales dependiendo de la especie pueden producir enfermedades como: pleuroneumonía contagiosa caprina, agalactia contagiosa, queratoconjuntivitis y poliartritis. Estas enfermedades son consideradas multifactoriales y de curso crónico en la mayoría de los casos, son de difícil diagnóstico y donde los factores predisponentes como infecciones recurrentes, hacinamiento, condiciones climáticas desfavorables, edad, constitución genética, estrés y manejo, juegan un papel importante (4).

Las especies como: *Mycoplasma mycoides var capri*, *Mycoplasma mycoides var mycoides*, *Mycoplasma capricolum* y *Mycoplasma F-38* se encuentran asociadas con la pleuroneumonía contagiosa caprina enfermedad de curso agudo que ocasiona elevados índices de morbilidad y mortalidad, ha sido reportada en Asia, Africa, en Europa, en Norteamérica y en México.

En México las lesiones de la pleuroneumonía contagiosa caprina fueron descritas en el año de 1964 por Aluja y col. (5). Tres años después Solana y Rivera aislaron *Mycoplasma mycoides var capri* de cabras que presentaban las mismas lesiones (6) Mientras que un estudio seroepizootiológico sobre la enfermedad reveló de un 12 a un 79 % de casos positivos en varios estados de la República Mexicana (7). Actualmente, en nuestro país no existe ningún tipo de reporte de la enfermedad.

Mycoplasma agalactiae, causante de la agalactia contagiosa de ovinos y caprinos produce principalmente mastitis, sin embargo también se ha encontrado asociado a problemas de artritis, queratoconjuntivitis, pleuresía y vulvovaginitis, con una mortalidad que puede alcanzar hasta 15%. Esta infección se ha reportado principalmente en ciudades del Mediterráneo. (8).

M. ovipneumoniae se ha aislado del aparato respiratorio de ovinos con neumonía proliferativa intersticial crónica, se le considera como un agente predisponente a la infección por otras bacterias. Esta especie de micoplasma ha sido aislada en cabras de México, Australia y Estados Unidos.

En nuestro país existe poca información relacionada con los diferentes tipos de enfermedades producidas por los micoplasmas en las cabras y solo existen, además de los trabajos realizados por Aluja y Solana (5,6) sobre la pleuroneumonía contagiosa caprina, dos trabajos relacionados con el aislamiento de micoplasmas de problemas de neumonía en ovinos y caprinos, uno realizado por Ciprián en 1978 (9) quien informó del aislamiento de *M. arginini* y *M. ovipneumoniae*, así como aislamientos que no pudieron identificarse y otro trabajo realizado por Jaramillo en 1987 que aisló *Mycoplasma spp* de pulmones neumónicos de cabras de rastros en el Edo. de México(10)

CAPITULO I

LOS MICOPLASMAS

1.Características de los Micoplasmas

Los Micoplasmas pertenecen a la clase Mollicutes orden Spiroplasmatales.

Se dividen en organismos helicoidales y no helicoidales, los helicoidales lo forman los Spiroplasma 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 Acholeplasma, estos microorganismos son comensales y no se consideran patógenos de los animales en condiciones normales. Los organismos no helicoidales dependientes de esteroides son los micoplasmas (ureasa negativos) y ureaplasmas (ureasa positivos) (4). Los micoplasmas son los organismos de vida libre más pequeños, son parásitos extracelulares, que se reproducen por fisión binaria, carecen de pared celular, y de membranas internas en sus estructuras, su membrana citoplasmática es trilaminar de 7.5 a 10 nm, la capa media es menos electrodensa que las otras dos, formada de lipoproteínas lo que le da cierta estabilidad a la membrana. Debido a la carencia de pared celular son extremadamente pleomórficos, es decir adquieren diversas formas: cocoide, cocobacilar, anillada, ramificada, filamentosa y agrupadas a manera de rosario, con diámetros de 200 a 400nm., los micoplasmas son dependientes de colesterol porque lo incorporan a su membrana con lo que crean una estabilidad osmótica para sobrevivir bajo condiciones fisiológicas normales, son anaerobios y aerobios facultativos, presentan una colonia típica con forma de huevo estrellado y son como ya se dijo ureasa negativos (4). Fig 1cuadro 1 y cuadro 2

Cuadro 1 Características y taxonomía de la clase *Mollicutes*

CLASIFICACION	No. DE ESPECIE	TAMAÑO DEL GENOMA (kb)	MOL% G+C DEL GENOMA	REQUERIMIENTOS DE COLESTEROL	PROPIEDADES	HABITAT
Orden I: <i>Mycoplasmatales</i> Familia I: <i>Mycoplasmataceae</i> Género I: <i>Mycoplasma</i> Género II: <i>Ureaplasma</i>	5 102 6	580-1,350 760-1,170	23-40 27-30	Si Si	Crecimiento óptimo a 37°C Hidrólisis de urea	Humanos y animales Humanos y animales
Orden II: <i>Entomoplasmatales</i> Familia I: <i>Entomoplasmataceae</i> Género I: <i>Entomoplasma</i> Género II: <i>Mesoplasma</i>	5 12	790-1,140 870-1,100	27-29 27-30	Si No	Crecimiento óptimo a 30°C Crecimiento óptimo a 30°C, 0.04% Tween 80 con un medio libre de suero	Insectos y plantas Insectos y plantas
Familia II: <i>Spiroplasmataceae</i> Género I: <i>Spiroplasma</i>	33	780-2,220	24-31	Si	Filamentos móviles y crecimiento óptimo a 30- 37°C	Insectos y plantas
Orden III: <i>Acholeplasmatales</i> Familia I: <i>Acholeplasmataceae</i> Género: <i>Acholeplasma</i>	13	1,500-1,650	26-36	No	Crecimiento óptimo a 30- 37°C	Animales, algunas plantas e insectos
Orden IV: <i>Anaeroplasmatales</i> Familia: <i>Anaeroplasmataceae</i> Género I: <i>Anaeroplasma</i> Género II: <i>Asteroleplasma</i>	4 1	1,500-1,600 1,500	29-34 40	Si No	Anaerobios Anaerobios	Rumen de rumiantes Rumen de rumiantes
<i>Phytoplasma</i>	No definido	640-1,185	23-29	No se sabe	No se ha cultivado	Insectos y plantas

Razin, S. 1998 (12)

Son muy difíciles de cultivar ya que debido a sus requerimientos nutricionales se tienen que utilizar medios enriquecidos que contengan: infusión de corazón, peptona, extracto de levadura, suero, colesterol, etc. Sin embargo el uso de estos medios puede interferir con la definición molecular de los micoplasmas, análisis genéticos, preparación de antígenos que deben estar libres de componentes del suero que se utiliza en el medio de cultivo.(4,9,11,12).

Son muy sensibles a las condiciones del medio ambiente como: el calor, detergentes, desinfectantes, antimicrobianos que inhiben los procesos de transcripción, translación; son resistentes a antimicrobianos con efecto sobre la síntesis de la pared celular. (11)

Cuadro 2 Propiedades que distinguen a los *Mollicutes* de otras eubacterias

Propiedades	<i>Mollicutes</i>	Otras eubacterias
Pared celular	Ausente	Presente
Membrana plasmática	Colesterol presente en muchas especies	Colesterol ausente
Tamaño del genoma	580-2,220 kb	1,050->10,00 kb
G+C contenido del genoma	23-40 mol%	25-75 mol%
No. De operones ribosomales RNA	1 a 2	1-10
Genes 5S rRNA	104-113 nucleótidos	>114 nucleótidos
No. De genes tRNA	30 (<i>M. capricolum</i>), 33 (<i>M. pneumoniae</i>)	84 (<i>B. subtilis</i>), 86 (<i>E. coli</i>)
UGA codon	Codon triptofano en <i>Mycoplasma</i> , <i>Ureaplasma</i> , <i>Spiroplasma</i> , <i>Mesoplasma</i>	Stop codon
RNA polimerasa	Resistente a rifampin	Sensible a rifampin

Razin, S. 1998 (12)



Figura 1 Colonias de micoplasmas Se observan las colonias en forma de huevo estrellado en medio sólido de Friis, mediante la prueba de peróxido de hidrógeno. Foto proporcionada amablemente por la Dra. Jaramillo.(INIFAP-SAGAR)

2.Habitat

Los micoplasmas se encuentran dispersos en la naturaleza como parásitos de mamíferos, reptiles, peces, artrópodos y plantas (13)

Como habitantes de humanos y animales, se encuentran principalmente en las mucosas: conjuntivas, cavidad nasal, faringe, laringe, mucosa intestinal, genitales y oídos. (11)

Los Spiroplasmas están dispersos en el intestino, hemocele y glándulas salivales de artrópodos (14)

3.Patogenicidad

La mayoría de los Mollicutes son comensales, aún para muchos artrópodos estos microorganismos son considerados también simbioses (15)

La patogenicidad de estos microorganismos está relacionada con procesos de: invasión celular, consumo de aminoácidos indispensables para las células como la arginina, producción de peróxido de hidrógeno que puede producir la pérdida de movimiento ciliar en la mucosa del aparato respiratorio y por mecanismos autoinmunes (2,9).

Los micoplasmas inician la infección adhiriéndose a los tejidos seguido de daño celular. La adherencia permite que los micoplasmas liberen sustancias como hemolisinas, enzimas proteolíticas, nucleasas y metabolitos tóxicos como: peróxido de hidrógeno y radicales superóxido que dañan la membrana celular, lo cual ocasiona que la célula huésped libere sus componentes esenciales o exista interferencia con sus funciones vitales (4).

Por ejemplo en el aparato respiratorio se asocia la presencia de micoplasmas con la pérdida de iones K^+ en tejidos como el epitelio bronquial ciliado, que también ocasiona la pérdida del movimiento ciliar (4).

Las células de los tejidos infectados con micoplasmas muestran un metabolismo alterado hacia los aminoácidos, debido a la competencia entre estos, principalmente hacia la arginina, como resultado de ello hay un retraso en el crecimiento de las células y muerte temprana (16)

Durante la infección por micoplasmas se ha observado que los componentes celulares del huésped puede adsorberse a la superficie de los micoplasmas, este evento los protege de las defensas del huésped limitando el desarrollo de anticuerpos específicos durante la enfermedad (17)

Los micoplasmas son invasores oportunistas de tejidos dañados como las articulaciones donde colonizan los cartílagos previa invasión de la membrana sinovial e inflamación de la articulación (18)

4.Especies de Micoplasmas asociados con procesos infecciosos en las cabras

El primer antecedente que se tiene involucrando al género *Mycoplasma* como responsable de un tipo de enfermedad en borregos y cabras resultó de la investigación de determinar el agente etiológico responsable de la agalactia contagiosa, enfermedad que había estado afectando a los rebaños por largo tiempo en Europa y Asia. Bridré y Donatien en 1923 mostraron que el microorganismo responsable de la agalactia presenta la morfología y requerimientos de crecimiento diferentes a otras bacterias, pero similares a los de la bacteria que producía la pleuroneumonía contagiosa bovina, asignándole el nombre de *M. agalactiae*. Más tarde Longley en 1951 demostró que el organismo que causa la pleuroneumonía contagiosa caprina poseía morfología similar (*M. mycoides var capri*)(8).

Al pasar de los años el número de especies nuevas de micoplasmas aisladas de cabras o borregos había sido relativamente bajo, y no fue sino hasta los años 70's y 80's que se aislaron la mayoría de las especies ahora conocidas.

No todas las especies de micoplasmas son patógenas para el huésped en el que se encuentran, pero los que son patógenos causan grandes pérdidas económicas (8).

4.1 Especies de micoplasmas aisladas de cabras

-*Mycoplasma agalactiae* que tiene como huésped a las cabras y a los borregos, afecta principalmente: ubre, articulaciones, ojos, tracto urogenital, orejas y es poco frecuente en pulmones. Su patogenicidad es alta. La infección se disemina por animales que se introducen al hato. En el desarrollo de la enfermedad puede observarse mastitis aguda unilateral o bilateral, a veces puede progresar a una septicemia y muerte de los animales afectados, en los animales que sobreviven se puede presentar artritis y queratoconjuntivitis.(10,19)

-*Mycoplasma arginini* sus huéspedes son: cabras, borregos, gamuza y otros; afecta principalmente el tracto respiratorio pero también se le ha aislado de tracto urogenital, articulaciones y ojos. Es poco patógeno (19).

-*Mycoplasma capricolum* tiene como huéspedes a las cabras y a los borregos, los sitios anatómicos que afecta son principalmente articulaciones, ubre, pulmones, oídos, tracto urogenital, ojos y puede presentarse septicemia. Es altamente patógeno ya que los hatos presentan una alta mortalidad y morbilidad. Los animales pueden presentar altas temperaturas principalmente en los cabritos con poca duración y en los adultos en la mayoría de las veces no se presenta, hay dolor en las articulaciones a los pocos días después de que el animal estuvo expuesto a la bacteria. También puede producir un síndrome parecido a la agalactia contagiosa (19).

-*Mycoplasma conjunctivae* afecta a cabras, borregos y gamuzas; los órganos que infecta son ojos y tracto respiratorio. Su patogenicidad es moderada. La enfermedad es introducida por un animal infectado que entre a un hato, es autolimitante, se disemina rápidamente, resultando en un brote de

queratoconjuntivitis. Los signos incluyen conjuntivitis, queratitis, incremento en la lacrimación (11,19).

-Mycoplasma spp. F38 afecta solamente a las cabras se encuentra principalmente en tracto respiratorio y ocasiona septicemia. Es altamente patógeno. Este micoplasma presenta una mortalidad del 68-100% y una morbilidad del 100%, los cambios patológicos generalmente se limitan a los pulmones (11,19).

Mycoplasma mycoides subespecie capri, el agente clásico de la pleuroneumonía contagiosa caprina afecta sólo a las cabras, los órganos que se ven involucrados durante la enfermedad son tracto respiratorio, articulaciones y oídos. Se considera altamente patógeno. Los animales infectados presentan pleuroneumonía, altas temperaturas y se niegan a comer (11,19).

Mycoplasma mycoides subespecie mycoides (LC) afecta principalmente a las cabras, se encuentra en el tracto respiratorio, ubre, articulaciones, ojos, oídos y a veces se presenta septicemia. Es moderadamente patógeno. Causa septicemia y poliartritis en cabras jóvenes, también causa peritonitis, linfadenitis, ocasionalmente neumonía, animales más grandes pueden desarrollar mastitis diseminando el organismo por la leche, también pueden presentar artritis, queratoconjuntivitis, infección en el oído como resultado de una micoplasmaemia (19,20).

-***Mycoplasma mycoides subespecie mycoides (SC)*** es muy raro en cabras pero cuando se presenta afecta tracto respiratorio y articulaciones (19).

-***Mycoplasma ovipneumoniae*** afecta cabras y borregos, lesiona tracto respiratorio, ojos y tracto urogenital. Su patogenicidad es baja. Se ha reportado que junto con *Pasteurella hemolítica* biotipo A produce una enfermedad crónica, neumonía atípica (19).

-***Mycoplasma putrefaciens***, se ha encontrado sólo en las cabras, se le ha aislado de ubre, articulaciones y oídos. Su patogenicidad es variable (3,19).

-***Mycoplasma adleri***, era conocido como cepa G145, que representa el primer y único aislamiento de la especie, fue aislado de un absceso en la articulación del tobillo de una cabra, durante un brote de artritis en Maryland en 1967. Los sitios anatómicos donde se encuentra son desconocidos al igual que su patogenicidad. (20)

De cabras también se han aislado otros micoplasmas, varios de los cuales no habían sido caracterizados: *Mycoplasmas spp* G ahora conocido como *M. yeatsii*, *Mycoplasma* U al que se le denominó como *M. auris*, y *Mycoplasma* V nombrado *M. cottewii*, estos micoplasmas fueron aislados primeramente del conducto auditivo de cabras clínicamente normales, y no se sabe aún si son patógenos (19,21).

Cottew y Yeats en 1981 observaron que del oído externo de las cabras se pueden aislar gran cantidad de micoplasmas incluyendo especies altamente patógenas, como lo son: *M. capricolum*, *M. putrefaciens* y *M. agalactiae* (21).

4.2 Características bioquímicas de las especies de Micoplasmas

Mycoplasma mycoides var mycoides

Existen dos tipos de esta especie, ya que presentan dos tipos de colonia que dependiendo de su tamaño se les denominó *M. mycoides var mycoides* LC (colonia grande) y *M. mycoides var mycoides* SC (colonia chica).

M. mycoides var mycoides SC digiere la caseína, licua el suero coagulado indicando su elevada actividad proteolítica, produce una gran turbidez cuando se cultiva en medio líquido (22,23).

Mycoplasma capricolum

Se caracteriza por presentar una elevada capacidad fermentativa de la glucosa, hidroliza la arginina, presenta actividad de fosfatasa, digiere suero coagulado, no forma película y manchas y reduce el tetrazolio en condiciones aeróbicas y anaeróbicas (22).

Mycoplasma agalactiae

No fermenta carbohidratos, ni hidroliza la arginina, forma película y manchas y reduce el tetrazolio tanto en condiciones aeróbicas y anaeróbicas (23,24).

Mycoplasma ovipneumoniae

Fermenta la glucosa, no hidroliza la arginina, no forma película y manchas, no digiere el suero coagulado, no presenta actividad de fosfatasa, reduce el tetrazolio en condiciones anaeróbicas, pero su reacción en condiciones aeróbicas es dudosa. Una característica de esta especie es que sus colonias no presentan centro (23,24,25).

Mycoplasma arginini

No fermenta la glucosa pero si hidroliza la arginina, no reduce el tetrazolio ni en condiciones aeróbicas ni en condiciones anaeróbicas, no forma película y manchas, no tiene actividad de fosfatasa y no digiere el suero coagulado (23,24).

Mycoplasma auris

No fermenta glucosa ni manosa, hidroliza la arginina, no hidroliza la urea, no reduce el tetrazolio, produce fosfatasa, no digiere el suero ni la caseína y no produce película ni manchas (26).

Mycoplasma cottewii

Fermenta la glucosa y la manosa, no hidroliza ni la urea ni la arginina, reduce el tetrazolio, no produce fosfatasa, no digiere el suero ni la caseína, no produce manchas o película (26).

Mycoplasma yeatsii

Fermenta la glucosa y manosa lentamente, hidroliza la arginina, reduce el tetrazolio, no produce fosfatasa, no hidroliza la urea, no digiere ni suero ni caseína y no produce manchas ni película (26).

Mycoplasma adleri

Hidroliza la arginina, no hidroliza la urea, no fermenta la glucosa, no produce fosfatasa, no digiere el suero y la reducción de tetrazolio es variable (20).

Las características bioquímicas principales de las diferentes especies de micoplasmas aisladas de cabra se presentan en el cuadro 3.

Cuadro 3 Bioquímicas de las diferentes especies de micoplasmas que se presentan en cabras.

Especie de Micoplasma	Glucosa	Arginina	Fosfatasa	Películas y Manchas	Tetrazolio Aero/anaero
<i>M. capricolum</i>	+	+	+	-	+ / +
<i>M. agalactiae</i>	-	-	+	+	+ / +
<i>M. ovipneumoniae</i>	+	-	-	-	Dudoso / +
<i>M. arginini</i>	-	+	-	-	- / -
<i>M. auris</i>	-	+	+	-	- / -
<i>M. cottewii</i>	+	-	-	-	+ / +
<i>M. yeatsii</i>	+	+	-	-	+ / +
<i>M. adleri</i>	-	+	-	-	Variable
<i>M. conjunctivae</i>	+	-	-	+	- / +
<i>M. putrefaciens</i>	+	-	+	+	+ / +

5.Pruebas serológicas: Inhibición de crecimiento e inhibición metabólica para serotipificar especies de Micoplasmas.

Nicol y Edward en 1953 observaron que el crecimiento de los micoplasmas se inhibe con antisueros específicos (27). Esta observación condujo al desarrollo de un método serológico específico y sencillo para identificar a las especies de micoplasmas.

Aunque es una reacción serológica altamente específica, la prueba de inhibición de crecimiento es poco sensible y los antisueros preparados para utilizarse deben presentar altos títulos.

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

Esto se consigue agregando sustratos apropiados que son utilizados por el microorganismo de prueba y agregando indicadores ya sea de oxido-reducción para aquellas especies que son capaces de reducir el colorante tetrazolio, o bien, un indicador de pH para aquellas especies fermentadoras de azúcares o capaces de hidrolizar la arginina. Esta es la base de la prueba de INHIBICIÓN METABÓLICA empleada también para la identificación de micoplasmas

CAPITULO II

Los ácaros

Los ácaros son artrópodos que pueden encontrarse diseminados en la naturaleza como parásitos o en forma libre. El oído externo de diversos huéspedes mamíferos domésticos y salvajes puede encontrarse parasitado por cierto tipo de ácaros principalmente de los géneros *Raillietia* y *Psoroptes* los cuales son habitantes del conducto auditivo externo, medio e interno. Los artrópodos que comúnmente se localizan en el conducto auditivo de los rumiantes son: *Raillietia auris*, *Raillietia caprae*, *Psoroptes cuniculli*.

En las cabras estos ácaros se ven frecuentemente en los meses de verano y menos en los meses de invierno (28).

Los ácaros se pueden transmitir con facilidad a nuevos huéspedes, sobre todo si son cabritos de pocos días de vida (29,30).

De las especies de ácaros mencionadas *Raillietia auris* ha mostrado ser capaz de causar otitis severas, en estos casos se ha observado la formación de una costra de cerumen en el canal del oído lo que da como consecuencia que los ácaros se encuentren en la base del canal del oído lejos del alcance de un cotonete (31,32)

1. *Raillietia caprae*.

La descripción de *Raillietia caprae* según Quintero y col (33) es la siguiente: la hembra mide de longitud total media 868.8 micrones; anchura total media 554 micrones; longitud media placa dorsal 554.1 micrones, anchura media placa dorsal 269.4 micrones, longitud media del quelícero 215.9 micrones. Fig. 2, 3, 4 y 5

En el gnatosoma presenta los quelíceros moderadamente esclerosados con un diente subterminal en el dedo fijo, muy cerca del pelo dental; dedo móvil más grande y con dos dientes en el tercio distal. Pocos procesos artrodiales. Tecto redondeado y muy esclerosado. Cornículos externos grandes, bien visibles. Surco deutosternal con 8 filas de 2 a 5 dientes en cada una. Región dorsal que presenta una placa dorsal con 17 pares de sedas y región libre con 15 pares.

Región ventral con tritos terno normal, placa esternal rectangular, con los tres pares de sedas. Placa genital pequeña, con las sedas genitales en el borde. Con siete pares de sedas en la región libre. Placa anal pequeña, romboidal. Peritrema normal, regularmente esclerosado.

Patas con coxas con quetotaxia normal. Trocánteres con 5-5-5-5. Quetotaxia del fémur como sigue: 2-3/1,2/2-2; 2-3/1,2/2-1;1-2/1,1/0-0;1-2/1,1/0-1. Quetotaxia de la genu: 2-3/2,1/3-2;2-3/1, 2/1-2; 2-2/1, 2/1-1; 2-3/1, 3/0-2. Quetotaxia de la tibia; 2-3/2, 3/2-2; 2-2/1, 3/1-2; 2-2/1, 3/1-2; 2-2/1, 3/1-2.

El macho presenta las siguientes medidas: una longitud total media 666.6 micrones, anchura total media 442.6 micrones. Longitud media de la placa dorsal 571.1 micrones, anchura media de la placa dorsal 333.9 micrones, longitud media del quelícero 234.4 micrones.

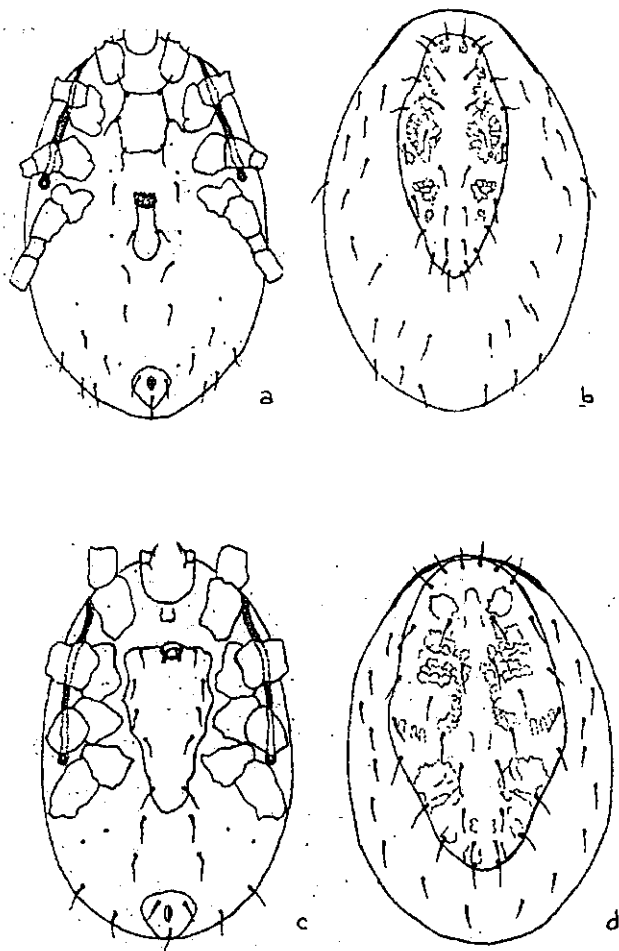
Gnatosoma con dedo fijo del quelícero reducido, dedo móvil fusionado con el espermadáctilo.

Región dorsal libre con 9 pares de sedas y región ventral con placa esternogenital con cinco pares de sedas, región libre con cuatro pares de sedas.

Pata II sin tubérculo ventral en el fémur; sedas en tibia y tarso modificadas.

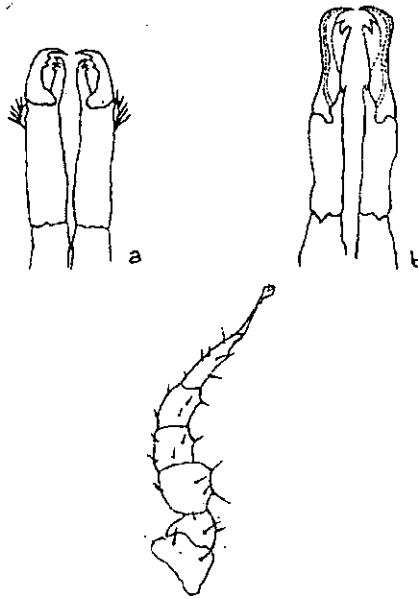
La larva de *Raillietia caprae* presenta las siguientes características: longitud total media 572.7 micrones, anchura total media 375.8 micrones.(33)

Se han hecho estudios en México donde se encontró que *Raillietia caprae* (Quintero, 1980) es capaz de producir otitis, sarna ótica e incoordinación de movimientos en las cabras, se encontraron lesiones como: placas caseosas, hemorragia petequial en mucosas, petequias en membrana timpánica, exudado purulento, congestión epitelial, congestión en membrana timpánica, entre las lesiones más frecuentes.(34).



Quintero, MT. 1980 (33)

Fig 2 Esquemas a y b *Raillietia caprae* hembra, a vista ventral y b vista dorsal;
Esquemas c y d *Raillietia caprae* macho, c vista ventral y d vista dorsal



Quintero, MT. 1980 (33)

Fig. 3 Esquemas de los quelíceros de *Raillietia caprae*; **a** hembra y **b** macho

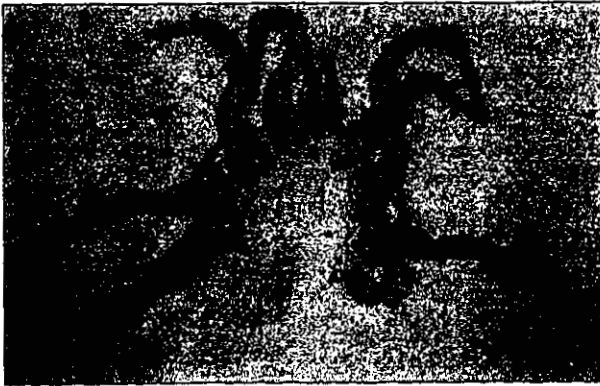


Fig. 4 Fotos de especimenes de *Raillietia caprae*

CAPITULO III

Acaros y Micoplasmas

Se ha visto que los ácaros pueden ser transmisores de ciertos géneros de bacterias; principalmente las hembras que son las que juegan un papel importante al pasar bacterias del orden *Spiroplasmatales*, o Rickettsias a su progeñie sobretodo a las hembras (35,36).

En el caso de los Spiroplasmatales microorganismos que habitan principalmente en plantas, artrópodos y animales, la transmisión puede ser por vía horizontal, es decir, los ácaros los adquieren por sus hábitos alimenticios o bien por vía vertical, transmisión transovárica. Y el que una transmisión sea eficiente también está influenciada por el medio ambiente (por ejemplo altas temperaturas pueden bajar la eficiencia de la transmisión). Hay una reducción en el número de bacterias que permanecen en el artrópodo, con lo que se minimiza la virulencia de la bacteria no afectando así el metabolismo del artrópodo para que la transmisión a su progeñie sea exitosa. (35)

En el caso de algunos artrópodos que tienen relación con los Spiroplasmatales, se ha visto que la bacteria está presente en la hemolinfa del huésped. (35)

Autores como DaMassa (37) han encontrado una asociación de los Micoplasmas con ácaros de el género *Raillietia*, y sugieren que cuando cambian de cabra a cabra transfieren los Micoplasmas (37,38).

Se piensa que los ácaros adquieren los micoplasmas por sus hábitos alimenticios, principalmente *P. cuniculli* el cual se alimenta de sangre completa después de

perforar los capilares sanguíneos (38,39); por este proceso los ácaros ingieren gran número de Micoplasmas principalmente cuando ocurre una micoplasmaemia, otros autores sugieren que la transmisión de los micoplasmas es vía transovárica y transestadial (40)

Se han realizado algunos trabajos sobre aislamiento e identificación de Micoplasmas y ácaros en muestras de cerumen del canal auditivo del oído de cabras. En E. U. Damassa realizó el aislamiento de *M. putrefaciens*, *M. capricolum*, *M. mycoides subsp. mycoides*; en cabras parasitadas con *R. caprae*. Mientras que en Australia Cottew and Yeats (21) efectuaron el aislamiento de *M. agalactiae*, *M. capricolum*, *Mycoplasma G.*, *M. putrefaciens*, *Mycoplasma U* y *Mycoplasma V* en cabras parasitadas también con este tipo de ácaros.

Estudios a nivel molecular han permitido clasificar y reconocer los aislamientos de micoplasmas identificados como G, U y V en nuevas especies: *Mycoplasma G* es ahora *M. yeatsi sp nov*, *Mycoplasma U* se conoce como *M. auris sp nov* y *Mycoplasma V* fue nombrado *M. cottewii sp nov* (26) ; por último en Brasil determinaron la presencia de *Raillietia caprae* en un número significativo de cabras y aislaron *M. mycoides* y *M. arginini*, del cerumen y lavados del ácaro pero siempre con la existencia de una relación entre los ácaros y los Micoplasmas del oído de las cabras.

Los pocos estudios realizados sobre la presencia de ácaros y especies de micoplasmas señala el aislamiento de diferentes especies de micoplasmas asociados con la presencia del ácaro.

Cottew and Yeats (21) sugieren, según un estudio en donde aislaron a *M. putrefaciens* de tejidos del ácaro y no directamente del oído, que estos ácaros podrían tener su flora independiente de Micoplasmas (21).

Al principio se creía que si las tonsilas estaban infectadas con micoplasmas, ésta podría haber sido la entrada de las bacterias hacia el oído, pero según los estudios hechos no siempre es así; también se creía que habiendo micoplasmas en el conducto auditivo externo y que por alguna lesión en la membrana timpánica se propiciaría la entrada de bacterias hacia el conducto auditivo interno (21).

También se ha postulado que si un hato tuvo historial de brotes de Micoplasmosis, la bacteria pudo haber estado en forma latente en el conducto auditivo (41).

No se conocen los posibles factores que contribuyen al mantenimiento o a la propagación de los micoplasmas en el conducto auditivo, pero podrían ser la presencia de ácidos grasos y el cerumen que provee una protección osmótica y libre de los mecanismos de defensa humoral y celular (42).

Raillietia caprae es un artrópodo que se encuentra distribuido en la población caprina de los diferentes estados de la República Mexicana, con índices de frecuencia que varían con el área geográfica y época estacional del año, observándose la frecuencia más alta durante los meses de verano (33,34); la presencia del ácaro como tal en el conducto auditivo de la cabra puede ocasionar problemas de otitis y en casos raros conducir a trastornos nerviosos dependiendo del grado de infestación; en la mayoría de los casos, sin embargo estos artrópodos pueden actuar como propagadores y reservorios de otros microorganismos en particular de especies de micoplasmas, algunas de ellas de importancia veterinaria.

La escasa información que se tiene relacionada con las especies de micoplasmas más frecuentemente asociadas con la presencia de *R. caprae* y la situación de determinar si el artrópodo favorece, la existencia de micoplasmas en el conducto auditivo de la cabra motivo la realización del presente trabajo.

OBJETIVOS

Aislamiento e identificación de Micoplasmas del conducto auditivo de cabras.

Aislamiento de Micoplasmas de *Raillietia caprae* del conducto auditivo de cabras.

Asociar la presencia de ácaros *Raillietia caprae* con la existencia de Micoplasmas en el conducto auditivo de las cabras.

HIPOTESIS

Existen por lo menos dos especies de Micoplasmas en ácaros *Raillietia caprae*

Existen varias especies de Micoplasmas en el conducto auditivo de cabras.

Si hay ácaros presentes en el conducto auditivo de las cabras existe la posibilidad de estar presentes bacterias del género *Mycoplasma spp*

CAPITULO IV

MATERIAL Y METODOS

1. Localización de los animales.

Las muestras se obtuvieron de canales de animales sacrificados en un rastro del Edo. de México, Querétaro y de Sinaloa.

2. Tamaño de muestra

El tamaño de muestra fue calculado de acuerdo al método propuesto por Selvin 1996, habiéndose obtenido un tamaño de muestra de $n=40$ (ver apéndice 1)

3. Toma de las muestras, tanto para aislar micoplasmas como para identificar los ácaros.

Las muestras que se colectaron fueron dos por cada oído del animal, se obtuvieron introduciendo directamente un hisopo estéril en el conducto auditivo interno y efectuando un movimiento giratorio dentro del conducto, después de lo cual los hisopos que se destinaron para aislamiento de micoplasmas se colocaron en tubos con tapón de rosca que contenían 3 ml. de medio de cultivo para micoplasmas (42) y los otros hisopos que fueron utilizados para determinar la presencia de los ácaros *R. caprae* se colocaron en bolsas de plástico nuevas.

4. Procesamiento de las muestras

4.1 Medio de cultivo

El medio de cultivo que se utilizó para el aislamiento y cultivo de los micoplasmas fue el medio Friis suplementado con 20% de suero de equino inactivado (56°C por 30min) y 10% de levadura fresca como inhibidores 0.1mg/ml de ampicilina y acetato de talio 1:4000 de concentración.

4.2 Identificación, lavado y trituración de los ácaros.

Los ácaros que fueron identificados como *R. caprae* se lavaron en 2 ml. de medio de cultivo, posteriormente los ácaros fueron retirados del líquido y se trituraron con ayuda de un capilar estéril en 500 microlitros de medio de cultivo.

El medio de cultivo utilizado en las obtención de las muestras, el medio de cultivo con el que se lavaron los ácaros y el medio de cultivo en el que se trituraron los ácaros va a llevar el siguiente procedimiento para el aislamiento de los micoplasmas y su posterior identificación

4.3 Diluciones e incubación del medio de cultivo

Se realizaron diluciones logarítmicas de medio de cultivo hasta la dilución 10^3 , se tuvo un tubo control, que se incubó junto con los otros tubos a 37° C por 24-96 h. Los tubos se observaron diariamente para determinar cualquier cambio de pH o cambio de turbidez en el medio indicativo de desarrollo de los micoplasmas. Después de este tiempo de incubación alícuotas de las diferentes diluciones se sembraron en placas de medio sólido de Friis, las cuales se incubaron en velobiosis hasta el desarrollo de las típicas colonias, las cuales se observaron bajo el

microscopio estereoscópico, para determinar diferencias en la morfología colonial y en el tamaño de ellas. Se tomaron colonias aisladas considerando estas diferencias mediante capilares e inoculando una sola colonia en medio líquido hasta que desarrollara nuevamente la bacteria, después de observar crecimiento se volvía a sembrar en medio sólido para tomar nuevamente una colonia aislada y repetir el procedimiento por 3 veces, posteriormente se realizó la identificación de los micoplasmas (42)

4.4 Identificación mediante pruebas bioquímicas y métodos serológicos.

4.4.1 Pruebas bioquímicas, ErnØ, H. 1973 (23)

4.4.1.1 Prueba de dependencia de esteroides.

Prueba de la Digitonina

Los aislamientos de micoplasmas purificados, se inocularon en medio sólido de Friis y sobre la superficie se colocaron discos de papel filtro impregnados con una solución de digitonina al 1.5 % previamente esterilizada por filtración y las placas se incubaron en velobiosis a 37°C hasta por 96hrs., en el género *Mycoplasma* se observa inhibición de crecimiento alrededor del disco lo que indica dependencia de esteroides para este género (23).

4.4.1.2 Películas y manchas

La película que se observa en la superficie del cultivo en medio sólido o líquido con micoplasmas, 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. (43)

4.4.1.3 Hidrólisis de la caseína

Es una prueba que nos permite conocer la actividad proteolítica de las diferentes especies de micoplasmas . Al medio de cultivo previamente esterilizado y antes de que gelificara se le adicionó leche descremada al 10%, sobre la superficie se le inoculan los micoplasmas de prueba y se incuban a 37°C durante 24-72 hrs. Una reacción positiva consiste en un halo claro alrededor de las colonias de micoplasmas. (22)

4.4.1.4 Reducción de tetrazolio

La actividad de las deshidrogenasas durante el metabolismo de algunas especies de micoplasmas, 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 el medio líquido conteniendo tetrazolio y se incuba a 37°C durante 48-72 hrs. (44)

4.4.1.5 Fermentación de carbohidratos

Esta prueba se realiza para determinar el patrón de fermentación de los micoplasmas a los carbohidratos, se inoculan los tubos con medio líquido y con el azúcar de prueba. Los tubos se incuban a 37°C y se observan los cambios de pH (23).

4.4.1.6 Prueba de hidrólisis de aminoácidos

Los aminoácidos que se utilizan son el clorhidrato de ornitina y clorhidrato de arginina que se adicionan al 1% al medio basal. La descarboxilación metabólica de los aminoácidos por algunas especies de micoplasmas se aprecia por un cambio alcalino en el medio. Los tubos se inoculan y se incuban a 37°C bajo condiciones aeróbicas por 7 días (23).

4.4.2_Pruebas serológicas

Para las pruebas de inhibición de crecimiento e inhibición metabólica se emplearon antisueros específicos a las especies de micoplasmas que afectan a ovinos y caprinos, los diferentes antisueros se obtuvieron del Colegio de Medicina Veterinaria de la Universidad de Florida, E. U.

Los antisueros que se emplearon en la prueba fueron los siguientes:

Antisuero-*M. ovipneumoniae*

Antisuero-*M. arginini*

Antisuero-*M. F38*

Antisuero-*Mycoplasma species*

Antisuero-*M. cottewii*

Antisuero-*M. yeatsii*

Antisuero-*M. auris*

Antisuero-*M. adleri*

Antisuero-*M. conjunctivae*

Antisuero-*M. putrefaciens*

Antisuero-*M. agalactiae*

Antisuero-*M. mycoides subsp mycoides*

Antisuero-*M. capricolum*

4.4.2.1 INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO

Para la ejecución de la prueba de inhibición de crecimiento se hicieron diluciones 1:2 de los antisueros y se impregnaron discos de 5 mm de diámetro con esta dilución para posteriormente colocarlos en placas de medio basal que fueron previamente sembradas con los diferentes aislamientos, se incubaron a 37°C en

velobiosis por 24-96 h. Después de este tiempo de incubación se realizó una observación directa de las placas con ayuda de un microscopio estereoscópico para determinar con que antisuero había inhibición de crecimiento. (45)

4.4.2.2 INHIBICIÓN METABOLICA

La prueba de inhibición metabólica se realizó en placas de cultivo celular de 96 pozos, en las que se hicieron diluciones dobles seriadas de los diferentes antisueros desde la dilución 1:2 hasta 1:256 para lo cual se despositó en la primera hilera de pozos 50 microlitros de cada antisuero, después se colocaron 25 microlitros de medio líquido de Friis, la última columna se utilizó como control, colocando en la primera hilera 50 microlitros de S.A.F (solución amortiguadora de fosfatos) estéril y en el resto de la columna 25 microlitros de medio líquido de Friis, a continuación se realizaron las diluciones de los sueros, posteriormente en cada pozo se colocaron 25 microlitros del aislamiento a identificar, finalmente en cada pozo se colocaron 50 microlitros de medio líquido de Friis y se procedió a la incubación de las placas a 37°C, bajo una atmósfera del 5% de CO₂ y en condiciones de humedad se registraron los cambios de color debidos a cambio de pH o las reacciones de óxido-reducción.

5.Análisis electroforético de los diferentes aislamientos de micoplasma

Se cultivaron los diferentes aislamientos en medio líquido de Friis por 48 h, al término de este tiempo, los cultivos se centrifugaron a 15000 g por 30 min., posteriormente se efectuaron 3 lavados del paquete celular con S.A.F. pH 7.2, finalmente el paquete celular se suspendió en un volumen de 50 microlitros y se le adicionó el mismo volumen de amortiguador de muestra conteniendo β -mercaptoetanol, las muestras se calentaron en baño maría por 10 min.

Los análisis electroforéticos se efectuaron en geles de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE) de acuerdo al método descrito por Laemmli (46), se utilizó un gel concentrador al 5% y un gel separador al 11% de acrilamida, colocándose 20 μ l de las diferentes muestras en los carriles correspondientes y en el último carril proteínas con peso molecular conocido como estándares; los corrimientos se efectuaron a 100 volts usando una solución amortiguadora de Tris-glicina pH 8.3 con SDS al 0.1%. Los geles se tiñeron con azul de Coomasie al 0.2% y se destiñeron con una mezcla de ácido acético/metanol, o bien algunas de ellas fueron teñidas con nitrato de plata según el método de Merrill y cols (47).

Una vez terminada la parte experimental se procedió al análisis de la información con ayuda de la estadística descriptiva, efectuando un análisis de J_i^2 mediante el programa estadístico JMP. (48,49,50)

Para obtener la prevalencia de micoplasmas, frecuencia de animales con ácaros y la asociación que hay entre la presencia de ácaros y la existencia de *Mycoplasma spp*

CAPITULO V

Resultados

Debido a que se tuvieron dificultades para localizar cabras positivas al ácaro, el grupo de animales positivas a él se limitó a sólo 20 animales; obviamente no se tuvo ninguna complicación para conseguir y trabajar con cabras negativas al ácaro por lo que este grupo quedó representado por 47 cabras.

De ambos grupos de animales se aislaron micoplasmas en la mayoría de los casos de un solo conducto auditivo.

1. AISLAMIENTOS DE MICOPLASMAS

Aunque para el grupo de cabras que no presentaron ácaros solo 9 de ellas fueron positivas a micoplasmas lo cual representa el 19%.

Para el grupo que presentaba ácaros, 15 fueron positivas al aislamiento de micoplasmas, cifra que representa el 75% de positividad.

2. PORCENTAJES DE AISLAMIENTOS DE MICOPLASMAS EN MACERADOS, LAVADOS Y DE HISOPOS CON CERUMEN.

Sin embargo cabe aclarar que en el grupo de animales positivos al ácaro se consideró positivo el aislamiento de micoplasmas, independientemente si este se recuperó directamente del cerumen, de lavado del ácaro o del macerado del ácaro. Sin tomar en cuenta el origen de la muestra en este grupo se recuperó un total de 34 aislamientos de micoplasmas, de los cuales 17 (50%) fueron de macerados del ácaro, 11 (32.3%) del cerumen y 6 (17.6%) del lavado de ácaros.

3. PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Se efectuó la caracterización bioquímica de los diferentes aislamientos para agruparlos de acuerdo a sus reacciones metabólicas a la glucosa, arginina, reducción de tetrazolio en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, cuadros 4 y 5. De acuerdo a estas características la mayoría de los micoplasmas de ambos grupos fermentan la glucosa, son negativos a la arginina y reducen el tetrazolio en condiciones aerobias y anaerobias.

4. PRUEBAS SEROLOGICAS

La identificación de las especies de micoplasmas se logró básicamente mediante pruebas serológicas empleando antisueros específicos y la caracterización bioquímica solo permite orientarnos a las posibles especies involucradas comparando los resultados de las pruebas bioquímicas con los reportados para las cepas tipo de las diferentes especies. Así las pruebas de inhibición de crecimiento e inhibición metabólica permitió identificar los diferentes aislamientos de micoplasmas; de acuerdo a la interpretación de los resultados observados, de los 43 aislamientos de micoplasmas obtenidos en el presente estudio, considerando ambos grupos de animales, 19 correspondieron a *M. adleri*, 18 a *M. yeatsii*, 3 a *M. putrefaciens*, 2 a *M. conjuntivae* y 1 a *M. cottewii*.

5. ESPECIES DE MICOPLASMAS QUE SE ENCONTRARON EN CABRAS CON ACAROS

Considerando solo el grupo de cabras que presentaron ácaros se observa que la mayoría de los aislamientos que se obtuvieron de este grupo fueron a partir de los ácaros macerados y fue donde hubo un mayor número de especies recuperadas.

Las especies identificadas en este tipo de muestras fueron *M. yeatsii*, *M. adleri*, *M. conjuntivae* y *M. cottewii*, observándose la frecuencia más baja para ésta última especie y la más alta para *M. yeatsii*, cuadro 7, De los lavados de *Raillietia caprae* se aislaron las especies *M. adleri*, *M. yeatsii* y *M. putrefaciens*, especie que no fue aislada de los macerados del ácaro, aquí la especie más frecuente fue *M. adleri*, cuadro 8. Las especies que se identificaron a partir de muestras de cerumen de cabras positivas a *Raillietia caprae* fueron las mismas que se recuperaron del lavado del ácaro, siendo la más frecuente nuevamente *M. adleri*, cuadro 9.

6. ESPECIES DE MICOPLASMAS QUE SE ENCONTRARON EN CABRAS SIN ACAROS

En el grupo de animales negativos a *Raillietia caprae* solo se recuperaron las especies *M. adleri* y *M. yeatsii*, con porcentajes de frecuencia similares entre ellas, cuadro 10. De acuerdo a estos resultados se observa una asociación más alta de recuperación de *M. yeatsii* a partir de macerados del ácaro, mientras que *M. adleri* pudo recuperarse de cualquiera de los tipos de muestra analizadas.

7. ANÁLISIS ELECTROFORETICO

En la prueba de inhibición metabólica para varios de los aislamientos identificados como *M. adleri* se observó cierto grado de inhibición con el antisuero a *M. yeatsii*, de hecho al agrupar los diferentes aislamientos identificados de acuerdo a su especie y a sus reacciones metabólicas a las diferentes pruebas bioquímicas efectuadas se observa un comportamiento bioquímico muy similar entre los aislamientos identificados como *M. yeatsii* y *M. adleri* cuadro 6, contrariamente a lo esperado no existe una concordancia en el comportamiento bioquímico entre los aislamientos correspondientes a *M. adleri* y *M. yeatsii* con las reacciones metabólicas reportadas para las cepas tipo que representan estas especies cuadro

3 y 6. Las diferencias pueden deberse a la composición del medio empleado o a los tiempos de incubación situaciones que afectan el comportamiento bioquímico esperado. Sin embargo debido a las similitudes en las reacciones bioquímicas observadas entre aislamientos de *M. adleri* y *M. yeatsii* y a las reacciones cruzadas que presentaron varias de ellas en la prueba de inhibición metabólica, se consideró necesario llevar a cabo una caracterización mayor de los aislamientos mediante un análisis electroforético. Los resultados del análisis efectuado a los extractos totales de los diferentes aislamientos de *M. yeatsii* y *M. adleri* muestran un perfil proteico casi idéntico entre estas dos especies, no fue posible apreciar claras diferencias entre un perfil y el otro.

El patrón electroforético muestra una gran diversidad de bandas protéicas comprendidas entre los 200 y 6 KDa, siendo las bandas de 200, 150, 120, 100, 80, 75, 60, 50, 45, 40, 35, 32, 30, 28, 25, 18, 12, 8 y 6 KDa las principalmente observadas; de éstas las que se expresan en mayor concentración son las proteínas de 80, 75, 45, 40, 28 y 6 KDa. Fig 6 y 7

Por otro lado, el análisis electroforético realizado a uno de los aislamientos correspondientes a la especie *M. conjuntivae*, mostró un perfil completamente diferente en comparación con el patrón observado para las demás especies aisladas. Se observan bandas protéicas comprendidas entre los 200 y 15 KDa , siendo más evidentes las de 80, 75, 32, 31 y 15 KDa.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de Ji cuadrada efectuado a los resultados indica que existe una fuerte asociación entre la presencia de ácaros y la existencia de micoplasmas ($P=0.0001$)

Para *M. putrefaciens*, se observaron bandas comprendidas entre los 200 y 18 KDa, siendo las más evidentes las bandas correspondientes a los 80, 75, 66, 60, 58, 45, 43 y 32 KDa.

En el caso de *M. cottewii*, se observa también una gran diversidad de bandas proteicas comprendidas entre los 200 y KDa, las bandas principales presentan pesos moleculares aparentes de 80, 76, 60, 38, 30 y 15 KDa.

Cuadro 4 Resultados de las pruebas bioquímicas de aislamientos de micoplasmas obtenidos de cabras sin ácaros

Glucosa	Arginina	Tetrazolio Anaero/aero	Número de aislamientos
+	+	+/+	1
+	-	+/+	5
-	+	+/+	1
-	-	-/+	1
+	-	-/+	1

Se puede observar que la mayoría de los aislamientos de este grupo de animales fueron fermentadores de glucosa y redujeron el tetrazolio.

Cuadro 5 Resultados de las pruebas bioquímicas de los aislamientos de micoplasmas obtenidos de cabras con ácaros

Glucosa	Arginina	Tetrazolio Anaero/aero	Número de aislamientos
+	+	+/+	4
+	-	+/+	17
-	+	+/+	3
-	-	-/+	1
+	-	-/-	6
+	-	-/+	1
+	-	+/-	1
		-/-	1

En este cuadro se puede observar que la mayoría de los aislamientos micoplasmas en cabras con ácaros fueron fermentadores de glucosa y redujeron el tetrazolio.

Cuadro 6 Pruebas bioquímicas practicadas a los diferentes aislamientos de micoplasmas identificados serológicamente.

Micoplasma	Glucosa	Arginina	Manosa	Fructosa	P y M	Tetrazolio Anaero/aero	H2O2	
<i>M. adleri</i> 19 aislamientos	16+ (84.25%) 3- (15.8%)	1+ (5.26%) 18- (94.74%)	18+ (94.7%) 1- (5.26%)	16+ (84.2%) 3- (15.8%)	5+ (35.7%) 14- (64.3%)	12 +/+ (63.1%)	7+ (36.84%) 12- (63.16%)	
<i>M. yeatsii</i> 18 aislamientos	17+ (94.44%) 1- (5.55%)	6+ (22.22%) 12- (77.78%)	17+ (94.44%) 1- (5.55%)	18+ (100%)	7+ (38.88%) 11- (61.11%)	14 +/+ (77.77%)	13+ (72.22%) 5- (27.78%)	
<i>M. cottewii</i> 1 aislamiento	1- (100%)	1-(100%)	1+(100%)	1-(100%)	1+(100%)	1 - /+(100%)	1+(100%)	
<i>M. putrefaciens</i> 3 aislamientos	2+ (66.6%) 1- (33.4%)	2+ (66.6%) 1- (33.4%)	1+ (33.4%) 2- (66.6%)	3+ (100%)	1+ (33.4%) 2- (66.6%)	3 +/+ (100%)	2+ (66.6%) 1- (33.4%)	
<i>M. conjuntivae</i> 2 aislamientos	2+ (100%)	1+ (50%) 1- (50%)	1+ (50%) 1- (50%)	1+ (50%) 1- (50%)	2- (100%)	1+/ (50%) 1-/ (50%)	1+ (50%) 1- (50%)	

Este cuadro nos presenta el comportamiento bioquímico de las diferentes cepas aisladas, si se compara con el cuadro 3, podemos observar que la mayoría de las cepas no se comportan como lo reporta la literatura, por ejemplo *M. adleri* y *M. yeatsii* tienen un comportamiento bioquímico un poco diferente al ya reportado por otros autores.

Se obtuvieron porcentajes en los que se aislaron las especies de micoplasmas.

Cuadro 7 Frecuencia de aislamientos de micoplasmas en macerados de *Raillietia caprae*

Especies de micoplasmas	número de cepas	porcentajes
<i>M. adleri</i>	5	33.33%
<i>M. yeatsii</i>	9	60.00%
<i>M. conjuntivae</i>	2	13.33%
<i>M. cottewii</i>	1	6.66%

Cuadro 8 Frecuencia de aislamientos de micoplasmas recuperados del lavado de los ácaros *Raillietia caprae*

Especies de micoplasmas	número de cepas	porcentajes
<i>M. adleri</i>	4	66.66%
<i>M. yeatsii</i>	1	16.66%
<i>M. putrefaciens</i>	1	16.66%

Cuadro 9 Frecuencia de aislamientos de micoplasmas recuperados del cerumen de cabras positivas a *Raillietia caprae*

Especies de micoplasmas	número de cepas	porcentajes
<i>M. adleri</i>	5	45.45%
<i>M. yeatsii</i>	4	36.36%
<i>M. putrefaciens</i>	2	18.18%

Cuadro 10 Frecuencia de aislamientos de micoplasmas recuperados del cerumen de cabras negativas a *R. caprae*

Especies de micoplasmas	número de cepas	porcentajes
<i>M. yeatsii</i>	4	44.4%
<i>M. adleri</i>	5	55.55%

Cuadro 11 Frecuencias de aislamiento de las diferentes especies de micoplasmas en base al origen del aislamiento en cabras positivas a *R. caprae*

Especie de micoplasma	Total de aislamientos	Macerado de <i>R. caprae</i>		Lavado de <i>R. caprae</i>		Muestras de cerumen	
		(frecuencia y porcentaje)	(frecuencia y porcentaje)	(frecuencia y porcentaje)	(frecuencia y porcentaje)		
<i>M. adleri</i>	14	5	35.7%	4	28.5%	5	35.7%
<i>M. yeatsii</i>	14	9	64.28%	1	7.1%	4	28.57%
<i>M. cottewii</i>	1	1	100%	0	0%	0	0%
<i>M. conjuntivae</i>	2	2	100%	0	0%	0	0%
<i>M. putrefaciens</i>	3	0	0%	1	33.33%	2	66.66%

La mayor parte de los aislamientos de *M. yeatsii* *M. cottewii* *M. conjuntivae* se obtuvieron del macerado de los ácaros.

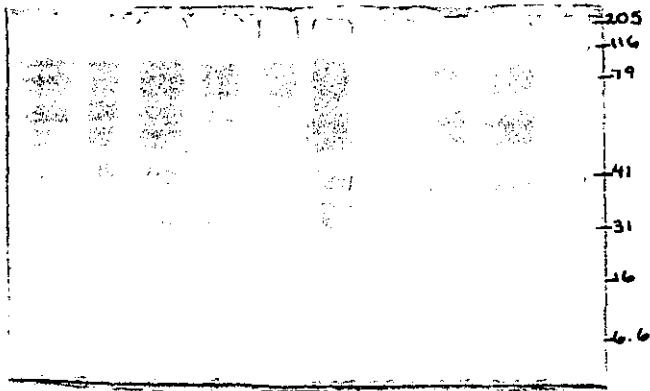


Fig 5. Análisis electroforético en SDS-PAGE al 11.5%. Carril 1 *M. cottewii*, carril 2 *M. yeatsii*, carril 3 *M. adleri*, carril 4 *M. yeatsii*, carril 5 *M. conjunctivae*, carril 6 *M. yeatsii*, carril 7 *M. yeatsii*, carril 8 *M. putrefaciens*, carril 9 *M. adleri* y carril 10 pesos moleculares.

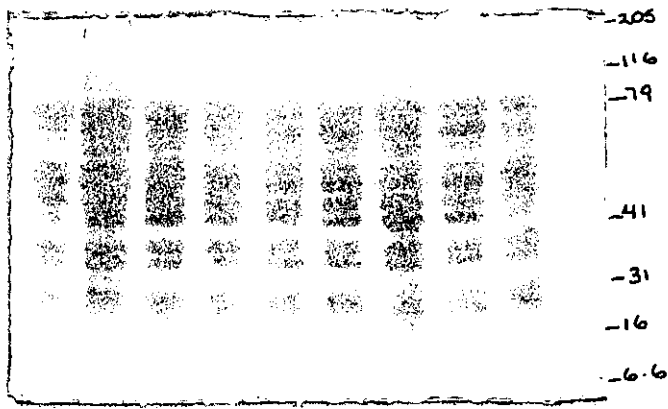


Fig 6. Análisis electroforético en SDS-PAGE al 11.5%. Carril 1 *M. yeatsii*, carril 2 *M. yeatsii*, carril 3 *M. yeatsii*, carril 4 *M. yeatsii*, carril 5 *M. adleri*, carril 6 *M. yeatsii*, carril 7 *M. yeatsii*, carril 8 *M. yeatsii*, carril 9 *M. yeatsii* y carril 10 pesos moleculares.

Figuras.5 y 6 Bandas de electroforesis que muestran las bandas de las especies de micoplasmas aisladas.

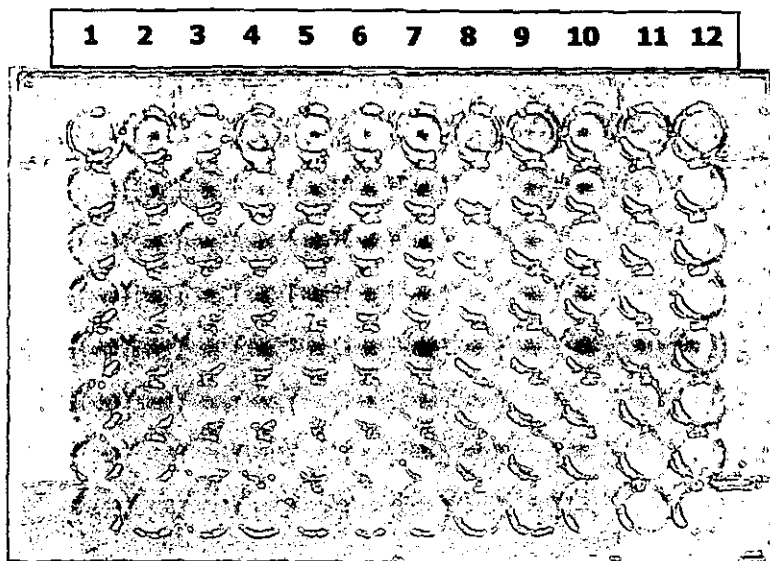


Figura 7 Foto de la prueba de inhibición metabólica.

Se puede observar la inhibición por ausencia del botón azul en los pozos del carril 8, en este caso la inhibición fue con el antisuero- *M. adleri*.

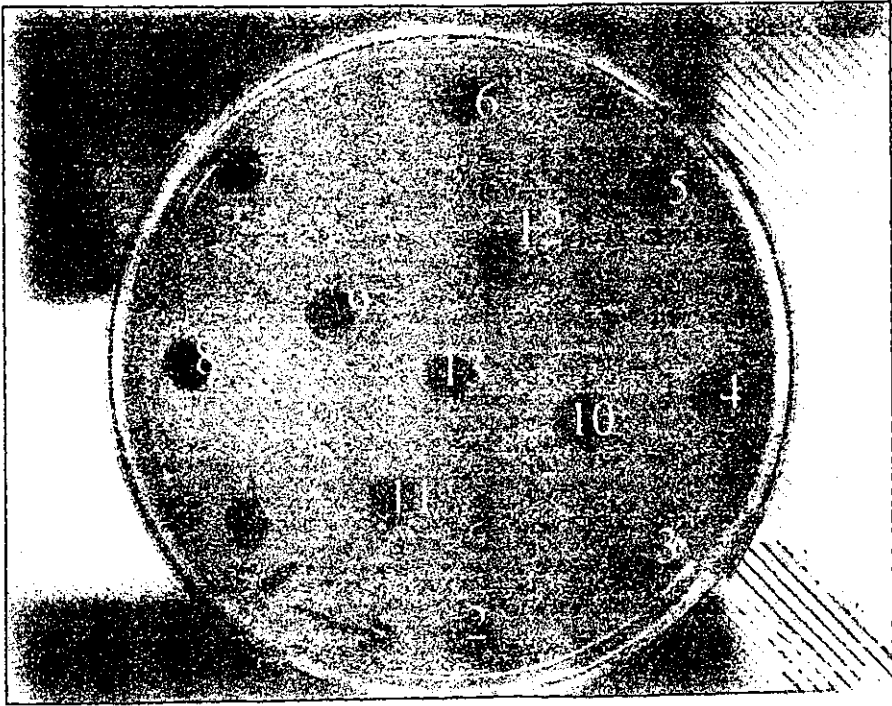


Figura 8. Prueba de inhibición de crecimiento.
Caja de Petri donde se observa la colocación de los discos de 5mm impregnados con los antisueros de las distintas especies de micoplasmas.

CAPITULO VI

Discusión

En el presente estudio se encontró que existe una fuerte asociación con el aislamiento de micoplasmas y la presencia del ácaro *R. caprae* en el conducto auditivo de las cabras, como lo muestra el alto porcentaje de recuperación obtenido de esta bacteria a partir de cabras parasitadas por el ácaro.

Comparando los grupos de animales en estudio se observa un porcentaje de recuperación de micoplasmas del 75% es decir 15 de 20 para aquellos animales positivos al ácaro, mientras que para los animales negativos a éste el porcentaje de recuperación fue del 19% es decir 9 de 47.

Los resultados observados concuerdan con lo reportado en otros países, por ejemplo en Brasil Ribeiro y colaboradores (51) encontraron que de 145 cabras parasitadas por *R. caprae* el 81.9% resultó también positivo a micoplasma; de manera similar al presente trabajo donde también se obtuvo un mayor aislamiento de la bacteria en macerados del ácaro que de los lavados, confirmando la estrecha relación entre la presencia de los ácaros y el aislamiento de micoplasmas. En el trabajo mencionado los autores aislaron *M. mycoides* y *M. arginini* pero no indican que especie se aisló con mayor frecuencia o cual fue la que se aisló más en los lavados, y aunque en este trabajo no se contempló el conteo de las colonias que crecían, y tampoco se aislaron las mismas especies, si se puede decir que *M. adleri* se aisló con más frecuencia de los lavados y que *M. yeatsii* fue la especie más frecuentemente recuperada de los macerados del ácaro; el análisis estadístico mostró que efectivamente hay una fuerte asociación entre la presencia de ácaros en el conducto auditivo y el aislamiento de especies de micoplasmas de esta zona anatómica.

En Australia Cottew y Yeats en 1982 (21) aislaron mezclas de diferentes especies de micoplasmas (*M. agalactiae*, *M. capricolum*, *M. putrefaciens*, *M. yeatsii*, *M. auris* y *M. cottewii*) en macerados de los ácaros *R. caprae*, así como del cerumen de los hisopos donde fueron colectados los ácaros, de éste último tipo de muestra aislaron las mismas especies de micoplasmas excepto *M. putrefaciens* mostrando la diversidad de especies que se pueden encontrar asociadas con los ácaros; de igual modo estos mismos autores señalan que de algunos de los animales muestreados recuperan especies de micoplasmas únicamente de los macerados del ácaro, pero no de los lavados o del cerumen, sugiriendo con este hecho la presencia de los micoplasmas en el interior de los ácaros.

En este trabajo, al igual que el anterior, se encontraron aislamientos de la bacteria únicamente en los macerados de los artrópodos de algunos de los animales, correspondiendo al 40% de las cabras positivas tanto a la presencia del ácaro como al aislamiento de los micoplasmas.

Se obtuvo un total de 34 aislamientos de micoplasmas del grupo de animales positivos al ácaro de los cuales se identificaron las especies *M. yeatsii*, *M. adleri*, *M. conjuntivae* y *M. cottewii*, observándose la mayor frecuencia de recuperación de las especies *M. yeatsii* y *M. adleri*. De estos 34 aislamientos el 50 % se obtuvo de los macerados de los artrópodos, y la especie principalmente aislada fue *M. yeatsii* con un 60%. Mientras que para el grupo de animales sin ácaros las únicas dos especies recuperadas fueron *M. yeatsii* y *M. adleri*, esta última con un 55.5%.

De las especies aisladas únicamente *M. conjuntivae* y *M. putrefaciens*, son consideradas patógenas para la cabra, especie en la que pueden producir problemas de queratoconjuntivitis, mastitis y artritis (19), *M. yeatsii* y *M. cottewii*

son especies que se han recuperado del conducto auditivo de cabras clínicamente sanas y se desconoce su potencial patógeno; mientras que de *M. adleri* existe un solo reporte de la especie que data del año de 1967 aislándose la bacteria a partir de un absceso de una articulación del miembro posterior de una cabra. En este estudio se obtuvieron 19 aislamientos de la especie antes mencionada, considerando ambos grupos de animales y destacando como la especie con mayor recuperación de las muestras.

Estudios similares reportan el aislamiento de especies potencialmente patógenas para la cabra a partir de ácaros o del cerumen, cabe señalar que algunos de estos estudios se realizaron en hatos con antecedentes de brotes de micoplasmosis a diferencia del presente trabajo donde las muestras se obtuvieron de animales aparentemente sanos.

En nuestro país, no existen reportes de enfermedades como la agalactia contagiosa o la pleuroneumonía contagiosa caprina producida por *M. capricolum* o *M. mycoides var capri* desde hace más de 30 años, enfermedades que han sido reportadas principalmente en Europa, Asia, África y Norteamérica, esto explicaría de alguna forma el hecho de que no se aislaron estas especies de micoplasmas en el presente trabajo.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo y lo que han observado otros investigadores del área se podría considerar que los ácaros y en particular *R. caprae* desempeña la función de vector de diferentes especies de micoplasmas, incluyendo aquellas patógenas para la cabra.

La frecuencia de aislamientos de *M. adleri* y *M. yeatsii* del conducto auditivo y de los ácaros localizados en este sitio anatómico hace suponer que estas especies son

habitantes normales de las cabras, con potencial patógeno hasta el momento desconocido.

Por otro lado debido al comportamiento bioquímico similar observado entre aislamientos de *M. yeatsii* y *M. adleri* y las reacciones cruzadas que presentaron varios de ellos en la prueba de inhibición metabólica se considero necesario realizar un análisis del perfil electroforético de las proteínas de los extractos totales de tales aislamientos correspondientes a *M. adleri* y *M. yeatsii*, el análisis mostró un perfil proteico casi idéntico entre aislamientos de estas dos especies, sin encontrar diferencias apreciables entre un perfil y el otro, observándose un gran número de bandas proteicas comprendidas entre los 200 y 6 kDa de las cuales las proteínas de 80, 75, 45, 40, 28 y 6 kDa están altamente expresadas.

Desafortunadamente no se contó con cepas de referencia de las diferentes especies, lo cual nos hubiera permitido corroborar por un lado la especificidad de los antisueros empleados en este estudio y por otro lado comparar los patrones electroforéticos entre las cepas de referencia y los aislamientos, para con ello poder discernir con base en los análisis que las cepas aisladas correspondían efectivamente a *M. yeatsii* o a *M. adleri*.

Sin embargo existe la posibilidad de que estos aislamientos pudieran representar una especie nueva o variantes de alguna de las especies de *M. yeatsii* o *M. adleri* debido al comportamiento bioquímico diferente entre los aislamientos y el que se ha reportado en la literatura para las especies mencionadas. Cabe mencionar nuevamente, que existe un solo reporte del aislamiento de *M. adleri* a nivel mundial y este representa la especie de referencia, no existiendo un mayor número de aislamientos de la especie, se desconoce si es que las hubiera si estas tendrían el mismo comportamiento bioquímico mostrado por la cepa de referencia.

Aparentemente sí se confirma por otro tipo de análisis a nivel molecular la similitud de los aislamientos aquí identificados como *M.adleri* con la cepa de referencia, se podría considerar que en este estudio se consiguió el mayor número de aislamientos de la especie de la cual no han existido otros reportes de su aislamiento, además de que estas fueron aisladas de un sitio anatómico diferente al de la cepa de referencia, y al parecer esta asociada con la presencia de el ácaro *R. caprae*.

CAPITULO VII

Conclusiones

- 1.-Se aislaron e identificaron *M. adleri* y *M. yeatsii* en conducto auditivo de cabras en ausencia de ácaros.
- 2.-Se aislaron e identificaron *M. adleri*, *M. yeatsii*, *M. conjuntivae*, *M. putrefaciens* y *M. cottewii* en ácaros provenientes del conducto auditivo de cabras.
- 3.-Se identifica por primera vez la presencia de *M. adleri* y *M. conjuntivae* en conducto auditivo de las cabras.
- 4.-Se encontró existe asociación de especies de micoplasmas y ácaros.
- 5.-La presencia del artrópodo en el conducto auditivo incrementa la frecuencia de micoplasmas en este sitio anatómico.

COMENTARIOS

Se considera que el trabajo cumplió satisfactoriamente con el protocolo y los objetivos propuestos.

Sin embargo, durante la realización de la investigación surgieron más dudas que no pudieron esclarecerse por que no estaban consideradas en los objetivos, estas fueron en cuanto a la presencia de los micoplasmas en los ácaros, en la patogenidad de *M. adleri*, *M. cottewii* y *M. yeatsii*, la similitud proteica que parecen tener *M. adleri* y *M. yeatsii*, en el tipo de lesiones que pueden existir en el oído de cabras que albergan a los ácaros y a los micoplasmas, y si esto favorecería que el animal desarrollara alguna enfermedad de las que se presentan con los micoplasmas.

Pero también se reporta la existencia de especies de micoplasmas que no habían sido estudiados en cabras mexicanas, lo cual indica que hacen falta estudios en patogenia y epidemiología de los micoplasmas; y finalmente hace falta estudiar a fondo el papel que juegan los ácaros en la transmisión de los micoplasmas.

BIBLIOGRAFIA

1. Battaglia, R y Mayrose V; Técnicas de manejo para Ganado y aves de corral; bovino, equino, ovino, porcino, caprino y aviar; Noriega-Limusa, México DF,1991.
2. Pijoan, P., Tortora, J.; Principales enfermedades de los ovinos y caprinos; Posgrado FES Cuautitlán UNAM Edo. México, 1986.
3. Smith, M.C. and Sherman, D M.; Goat Medicine; Lea and Febiger; United States of America 1994.
4. Rosa Elena Miranda Morales; Patogenicidad de Micoplasmas involucrados en la mastitis bovina;(tesis de maestría) Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. 1999
5. Aluja, A.S. Un brote de pleuroneumonía en cabras causado por *Mycoplasma mycoides*. Med. Vet. Zoot. 1964; III: 77-87.
6. Solana, M.P. and Rivera, E. Infection of goats in Mexico by *Mycoplasma mycoides* var capri; Ann. N.Y. Acad. Sci.; 1967; 143: 357-363
7. Solana, M.P. and Udave, L.M.; Estudios epizootiológicos de la pleuroneumonía contagiosa de las cabras; Tec. Pec. En Mex. 1966; 97: 205-206.
8. Tully, J G. and Whitcomb R F; The Mycoplasmas, Vol. II Human and Animal Mycoplasmas; Academic Press 1979.
9. Ciprián, A. C.: Aislamiento y caracterización de micoplasmas a partir de pulmones neumónicos de ovinos y caprinos en México (Tesis de maestría).México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM 1977.
10. Jaramillo, L.M.; Aislamiento y caracterización de Micoplasmas obtenidos de pulmones neumónicos en cabras (Tesis de Licenciatura) Cuautitlán Izcalli Edo. de México; Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM 1987.
11. Rosendal, S; Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals; edited by Gyles C and Thoen Ch; 2a. edition, Iowa State University/Ames. 1993

12. Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular Biology and Pathogenicity of Micoplasmas, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Dec 1998; 62: 1094-1156.
13. Razin, S.;1992. *Mycoplasma* taxonomy and ecology, p. 3-22 In. J. Maniloff, R. N. McElhancy, L.R. Finch, and J.B. Baseman (ed) *Mycoplasmas:molecular biology and pathogenesis*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
14. Whitcomb R.F. and Tully J.G. (ed) 1989 *The Micoplasmas*, vol. V *Spiroplasmas, acholeplasmas, and micoplasmas of plants and arthropods*. Academic Press, Inc. San Diego Calif.
15. Hackett, K.J. and Clark T. B. 1989,. *Ecology of spiroplasmas*, p.113-200. In R.F Whitcomb and J.G. Tully (ed). *The Micoplasmas*, vol 5. *Spiroplasmas, acholeplasmas, and micoplasmas of plants and arthropods*. Academic Press, Inc. , San Diego, Calif.
16. Shimke, R.T. and Barile M. F. Arginine metabolism in pleuropneumonia-like organism isolated from mammalian cell culture. *J. Bact.* 1963; 86: 195-206.
17. Kion, T. A. y Hoffman G.W. Anti HIV and anti-anti MHC antibodies in alloimmune and autoimmune Mice. *Sciences*. 1991; 253: 1138-1140.
18. Razin, S. and Barile M.F.; *The Micoplasmas*, Vol IV *Mycoplasmas Pathogenicity*; Academic Press 1985.
19. DaMassa, A. J. et all; *Mycoplasmas of goats and sheep*; *J. Vet. Diagn. Invest.*; 1992; 4: 101-113.
20. Del Giudice, R.A. et all; *Mycoplasma adleri sp nov.*, an isolate from a goat; *International J. of Systematic Bact*; 1995; 45:29-31
21. Cottew, G.S. and Yeats, F. R., *Mycoplasmas and mites in the ears of clinically normal goats*; *Australian Vet Jour*; 1982.;59: 77-81.
22. Whitford, H. W., Rosenbusch R.F., *Mycoplasmosis in animals. Laboratory Diagnosis*. Iowa State Univ. Press New York. 1994.
23. Ernø H, Stipkovits L. Bovine Mycoplasmas: Cultural and biochemical studies II; *Acta Scandinava*; 1973; 14:450-463.

24. Jasper DE, Dellinger JD. Isolation of exotic mycoplasma from goats. Proc. Am. Ass. Vet. Lab. Diagn. 1979; 22: 119-126.
25. St George TD, Carmichael LE. Isolation of *Mycoplasma ovipneumoniae* from sheep with chronic pneumonia. Vet. Rec., 1975; 97: 205-206.
26. DaMassa AJ. *Mycoplasma auris sp nov*, *Mycoplasma cottewii sp. nov* and *Mycoplasma yeatsii sp nov.*, New sterol-requiring mollicutes from the external ear canals of goats, International J. of Syst. Bact., 1994; 44: 479-484.
27. Nicol, C.S. and Edward, D.G.; Role of organisms of the pleuropneumonia group in human genital infections; Br. J. Vener. Dis, 1953; 29:141-150.
28. Littlejohn AI. Psoroptic mange in the goat; Vet. Rec, 1968; 83:148-155.
29. Williams JF, Williams CSP. Psoroptic ear mites in dairy goats; J. Am. Vet. Med. Assoc, 1978; 1978; 173: 1982-1983.
30. Friel J, Greiner EC. Ear mites from domestic goats in Florida. Exp Appl Acarol. 1988; 4: 345-351.
31. Cook RW. Ear mites, *Raillietia manfredi* and *Psoroptes cuniculli* en goats in New South Wales, Aust. Vet. J., 1981; 57: 72-75.
32. Heffner R, Heffner H. Occurrence of the cattle ear mite (*Raillietia auris*) in southeastern Kansas; Cornell Vet; 1982: 73: 193-199.
33. Quintero Ma. T. Hallazgo y descripción de *Raillietia caprae sp. nov.*(Acari Mesostigmata, Raillietidae) en caprinos de Sinaloa, México.; Veterinaria México; 1980; 11: 17-20.
34. Quintero Ma. T. Frecuencia de ácaros *Raillietia caprae* y lesiones macroscópicas en caprinos sacrificados en el rastro municipal de Nezahualcóyotl, Estado de México; Veterinaria México; 1987;18: 39-44.
35. Hurst, G.D. and Jiggins, F. ; Male-killing Bacteria in Insects: Mechanisms, Incidence, and Implications.; Emerging Infectious Diseases; 2000: 6:329-336.
36. Hackett KJ, Clark T B. Ecology of spiroplasmæ, In Whitcomb R.F. Tully J.G. editors The Mycoplasmas, vol. 5. Spiroplasmæ, acholeplasmæ, and

- mycoplasmas of plants and arthropods. San Diego, Calif. Academic Press. p.113-200.
37. DaMassa, A.J.; The ear canal as a culture site for demonstration of mycoplasmas in clinically normal goats, *Aust. Vet. J.*, 1990; 67: 267-268.
 38. DaMassa; A. J. and Brooks, D. L.; The external ear canal of goats and other animals as a mycoplasma habitat; *Small Ruminant Research*; 1991; 4: 85-93.
 39. Wright, F.C. and DeLoach, J.R.; Ingestion of erythrocytes containing Cr-labeled hemoglobin by *Psoroptes cuniculli* (Acari:Psoroptidae), *J. Med. Entomol.*, 1980; 17: 186-187.
 40. Ribeiro, V. R. et al; Mycoplasma transmission among caprines by *Rallietia caprae* (Mesostigmata) in Brazil In: *Sec Acari and Human Diseases*, Mitchell R, Horn D, Neddham G and Welbourn C editors *Acarology IX Proceedings*, Columbus, Ohio 1993: 483-484
 41. Hazell, S.L.; Mycoplasma mycoides subsp mycoides in the ears of goats associated with an outbreak of systemic mycoplasmosis; *Australian Vet. J.*; 1985;62:421.
 42. DaMassa, A.J.; Prevalence of Mycoplasmas and Mites in the External Auditory Meatus of Goats; *California Veterinarian*; 1983;12: 10-13, 17.
 43. Freundt, E.A., Film and spot production. In *methods in Mycoplasmaology*. Barile M.F., Razin S., Tully J.G. vol 1. New York. Academic Press. 1983: 373-374.
 44. Freundt E.A. *The Mycoplasmatacea*. Munksgaard, Copenhagen. 1958.
 45. Wallace, A and Clyde, J., Growth inhibition tests in *methods in Mycoplasmaology*, vol. I, *Mycoplasma characterization*; ed. Razin S. and Tully G.J., Academic Press 1983.
 46. Laemmli, U.K.; Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4; *Nature, London*; 1970; 227: 680-685.
 47. Merrill, C.R., Switzer, R.C. and Van Keuren, M.L.; Trace polypeptides in cellular extracts and human body fluids detected by two-dimensional electrophoresis

- and a highly sensitive silver stain; Proc, Natl, Acad. Sci. USA; 1979; 76: 4335-4339.
48. Daniel, W.W.; Bioestadística bases para el análisis de las ciencias de la salud; Uteha; 1997.
49. Rothman, K.; Epidemiología moderna; Diaz de Santos; 1987.
50. JMP; Statics and Graphics Guide; versión 3.1.6.2.; SAS Institute, Inc. NC. USA. 27513, 1959-1996.
51. Ribeiro R. V. et all; Presencia de *Micoplasma* em exemplares de *Raillietia caprae* colectados do conduto auditivo externo de caprinos; R. Bras. Med. Vet; 1995; 17: 122-124.
52. Selvin, S.; Statical analysis of epidemiologic data: Monographs in epidemiology and biostatistics; Oxford University Press; 25: 1996.

Apéndice

Apéndice 1

Cálculo del tamaño de muestra.

El número de observaciones (N) se calculó con base en el método propuesto por Selvin en 1996, a partir de la expresión

$$n = \text{factor} (Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 / 2(\text{arcoseno } \sqrt{P} - \text{arcoseno } \sqrt{P'})$$
 donde factor de Z son $Z_{\alpha} = 1.96$ y $Z_{\beta} = 1.282$ para prueba bilateral $P_1 = 0.30$ y $P_2 = 0.70$ que representan las proporciones de casos positivos esperados en los grupos sin ácaros y con ácaros respectivamente, con una significancia de $\alpha = 0.05$, con una proporción esperada de positivos a micoplasmas con ácaros del 70% y de los que no tienen ácaros una proporción esperada de positivos del 30 %, para potencia mínima de la prueba de 90% para muestras con ácaros y sin ácaros fijas de entre mínimo 40 observaciones (cabras) (52). Formando así un grupo con ácaros y otro sin ácaros.

Apéndice 2

Cuadro 2X2 para el análisis de los datos estadísticos y pruebas que se realizaron.

Total	Con ácaros	Sin ácaros	
% total			
% por fila			
% por columna			
% esperado			
Sin micoplasmas	38	5	43
	56.72	7.46	64.18
	88.37	11.63	
	80.85	25.00	
	30.1642	12.8358	
Con micoplasmas	9	15	24
	13.43	22.39	35.82
	37.50	62.50	
	19.15	75.00	
	16.8358	7.16418	
	47	20	67
	70.15	29.85	

Con una Probabilidad de ser > que Ji cuadrada de <.0001, con una kappa de .528169 y un error estándar de 0.109448