



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**ESTANDARIZACIÓN DE LAS PRUEBAS DE FIJACIÓN DE
COMPLEMENTO Y AGLUTINACIÓN INDIRECTA PARA EL
DIAGNÓSTICO DE MICOPLASMOSIS CAPRINAS
ASOCIADAS A PROBLEMAS RESPIRATORIOS EN MÉXICO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

JOSÉ LUIS CORONA VARGAS

Asesoras:

DRA. ROSA ELENA MIRANDA MORALES

MVZ. ESP. MYRNA ALICIA VICENCIO MALLÉN



MÉXICO D. F.

2007



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.

"Está en la mano del hombre
hacer desaparecer de la tierra
las enfermedades parasitarias"

Louis Pasteur
(1822 ~ 1895)

DEDICATORIA

A mi Mamá *Gloria Vargas Nicasio*

No importa lo difícil que sea el panorama, tu me enseñaste que siempre es posible seguir adelante y a valorar las pruebas que el destino nos pone en el camino. Me diste una formación personal y académica; ahora con tu amor, apoyo, regaños, alegrías y con una vida por vivir, es que podemos decir ***Promesa cumplida.***

A mi Papá *José Luis Corona Martínez[†]*

Aún en tu ausencia física, me ayudaste a madurar y día con día me pones en el camino tantas cosas que aprender, siempre estás y estarás conmigo dándome luz en mi camino. Confiaste en mí para una responsabilidad enorme y no te voy a fallar.

A mi Hermana *Citlali Corona Vargas*

La fortuna no se mide en riquezas o bienes, sino en el apoyo, cariño y comprensión que tu familia te da, soy muy afortunado por que eres mi hermana y siempre me has dado todo eso y mas.

“Gracias a las 3 personas mas importantes en mi vida...

MI FAMILIA

Los quiero muchísimo.”

AGRADECIMIENTOS

A mi Familia

Mis abuelitos Lalito[†] y Lupita[†], mis tíos y primos, gracias por el gran apoyo que nos han dado.

A Eugenia Vargas

Por que siempre me has extendido la mano cuando lo he necesitado.

A Ángel Vargas

Eres uno de los principales culpables de que haya elegido ésta maravillosa profesión y por eso mil gracias.

A mis Asesoras

Dra. Rosa Elena Miranda y MVZ Esp. Myrna Vicencio, por compartir conmigo sus conocimientos y experiencias, por sus regaños y confianza, por enseñarme el mundo de los micoplasmas y la serología, marcando así el destino de aquel muchacho aspirante a MVZ que llegó un día a la Facultad, pero principalmente por su apoyo y amistad.

A mi jurado

Dr. Roberto A. Cervantes Olivares, Dr. Gilberto Chávez Gris, M. en C. Edgar Alfonseca Silva, Dra. Rosa Elena Miranda Morales y Dr. Jaime Campuzano Granados. Por su disposición y conocimientos aportados a éste trabajo

Al personal del Laboratorio de Serología

Myrna, Gris, Esther y Cristy por que han sido parte fundamental durante TODA mi formación como MVZ y como persona.

Martín, Yara, Romina, Juan Carlos y Vero por su gran ayuda en la realización de éste trabajo.

Al personal del Laboratorio de Micoplasmas

Rosa Elena, Verónica, Alejandro y Sra. Georgina por su apoyo en el Laboratorio, en los muestreos realizados y por su amistad.

A la Dra. Frida Salmerón

Por su invaluable ayuda e incontables horas dedicadas a guiarme en el camino de los números.

Al personal del Departamento de Microbiología e Inmunología

Dr. Alejandro de la Peña, Lupita, Rosalba, Cindy, Mauricio, Rodrigo Téllez, Dr. Basurto y a todo el DMel por compartir conmigo tantas cosas y mostrarme su apoyo.

A mis hermanos de la Tuna de la Facultad de Economía de la UNAM

Por las grandes aventuras que hemos vivido (y las que faltan!!!), por estar conmigo en todo momento y compartir juntos ésta gran experiencia que iniciamos y ha traspasado las fronteras.

A mis hermanos de la Tuna de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM

Por las aventuras compartidas (y las que faltan!!!), por hacerme parte de la *Única y Legendaria Tuna Veterinaria* y por todas esas veces en que hemos cantado juntos “De México para el mundo.....”

A los conejos y cobayos

Que dieron su vida para la elaboración de antisueros y obtención de complemento.

A los ovinos

Que me brindaron su sangre para la elaboración de reactivos.

A los equinos.

Que me aportaron suero sanguíneo para de medio de cultivo.

A los caprinos

Por proporcionarme las muestras de suero para la realización de las pruebas.

A los propietarios, al Com. de Fom. y Prot. Pec. del Edo. de Méx., al Instituto para el Desarrollo de la Mixteca y a la Asociación de Caprinocultores de Guanajuato

Por su disposición y apoyo para realizar los muestreos.

A todos las personas que me permitieron compartirles mis alegrías, frustraciones, desplantas y demás que tuve durante la realización de éste trabajo.

Al Dr. Francisco José Trigo Tavera

Por su apoyo como responsable del proyecto

Al proyecto PAPITT IN215506-3 DGAPA-UNAM

Por el financiamiento en la realización del trabajo.

CONTENIDO

	Página
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
CONTENIDO	VI
ABREVIATURAS	X
RESUMEN	1
1.0 INTRODUCCIÓN	3
1.1 Antecedentes	3
1.2 Reportes de las micoplasmosis caprinas en México.....	4
1.3 Clasificación taxonómica de los micoplasmas	6
1.4 Características generales	7
1.5 Características de cultivo	9
1.6 Factores de virulencia	9
1.7 Respuesta inmune contra los micoplasmas	10
1.8 Enfermedades causadas por <i>Mycoplasma</i> spp. en los caprinos	11
1.9 Diagnóstico	14
1.10 Tratamiento	18
1.11 Profilaxis y control	18
2.0 HIPÓTESIS	20
3.0 OBJETIVOS	20

3.1	Objetivo general	20
3.2	Objetivos específicos	20
4.0	MATERIAL Y MÉTODOS	21
4.1	Elaboración de antígeno concentrado de <i>Mycoplasma</i> spp.	21
4.2	Elaboración de antisueros contra <i>Mycoplasma</i> spp.	22
4.3	Reacción cruzada de <i>Mycoplasma</i> spp.	24
4.4	Determinación de las características del Ag para las pruebas de FC' y AI	24
4.5	Estandarización de los elementos de la prueba de fijación de complemento..	25
4.5.1	Sistema hemolítico	25
4.5.1.1	Elaboración de hemolisina	25
4.5.1.2	Suspensión de glóbulos rojos de ovino al 2%	26
4.5.2	Obtención del complemento	27
4.5.3	Titulación de hemolisina y complemento	27
4.5.4	Titulación del antígeno de <i>Mycoplasma</i> spp.	28
4.5.5	Titulación de los antisueros contra <i>Mycoplasma</i> spp.	30
4.6	Estandarización de los elementos de la prueba de aglutinación indirecta	30
4.6.1	Obtención de glóbulos rojos de ovino	30
4.6.2	Fijado de los glóbulos rojos de ovino	30
4.6.3	Tanado de los glóbulos rojos de ovino fijados	31
4.6.4	Sensibilización de glóbulos rojos de ovino tanados	31
4.6.5	Titulación del antígeno de <i>Mycoplasma</i> spp.	31
4.6.6	Titulación de los antisueros contra <i>Mycoplasma</i> spp.	32
4.7	Determinación del tamaño de la muestra	32
4.8	Muestras de campo	32

4.8.1 Distrito Federal	33
4.8.2 Estado de México	34
4.8.3 Guanajuato	35
4.8.4 Morelos	36
4.8.5 Baja California Sur	37
4.8.6 Región Mixteca (Guerrero y Oaxaca)	37
4.8.7 Clasificación de los rebaños	38
4.9 Procesamiento de las muestras de campo	39
4.9.1 Prueba de fijación de complemento	39
4.9.1.1 Tratamiento anticomplementario	39
4.9.1.2 Controles de la prueba	39
4.9.1.3 Metodología de la fase invisible	40
4.9.1.4 Metodología de la fase visible	40
4.9.1.5 Interpretación de los controles de la prueba	40
4.9.1.6 Interpretación de la prueba	41
4.9.2 Prueba de aglutinación indirecta	42
4.9.2.1 Adsorción de los sueros	42
4.9.2.2 Controles de la prueba	42
4.9.2.3 Metodología de la prueba	42
4.9.2.4 Interpretación de los controles de la prueba	43
4.9.2.5 Interpretación de la prueba	43
4.10 Determinación del punto de corte	44
4.11 Prueba de homogeneidad de Xi cuadrada	44
4.12 Determinación de la sensibilidad y especificidad de las pruebas	44

5.0 RESULTADOS	45
5.1 Antiseros contra <i>Mycoplasma</i> spp.	45
5.2 Reacción cruzada de <i>Mycoplasma</i> spp.	45
5.3 Determinación de las características del antígeno	46
5.4 Titulación de los antiseros contra <i>Mycoplasma</i> spp.	46
5.5 Determinación del punto de corte	47
5.6 Resultados de las muestras de campo	48
5.6.1 Fijación de complemento	48
5.6.2 Aglutinación indirecta	48
5.7. Prueba de homogeneidad de Xi cuadrada	49
5.8 Determinación de la sensibilidad y especificad de las pruebas	57
6.0 DISCUSIÓN	58
6.1 Características del antígeno	58
6.2 Punto de corte	58
6.3 Resultados de las muestras de campo	59
6.3.1 Rebaños sin micoplasmosis	59
6.3.2 Rebaños con antecedentes de micoplasmosis	60
6.3.3 Rebaños con micoplasmosis	60
6.4 Sensibilidad y especificidad de las pruebas	61
7.0 CONCLUSIONES	62
8.0 REFERENCIAS	63
9.0 FIGURAS	71
10.0 CUADROS	74
11.0 APÉNDICES	77

ABREVIATURAS

(-)	Negativo
(+)	Positivo
μg	Microgramo (s)
μl	Microlitro (s)
Ac ('s)	Anticuerpo (s)
ADN	Ácido desoxirribonucleico. <i>Deoxyribonucleic acid</i>
AF	Alpina francesa
Ag ('s)	Antígeno (s)
AI	Aglutinación indirecta
antic'	Anticomplementario (s)
ARN	Ácido ribonucleico. <i>Ribonucleic acid</i>
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal. <i>Ribosome ribonucleic acid</i>
B. C. S.	Baja California Sur
BR	Boer
C'	Complemento
c.b.p.	Cuanto baste para
CEIEPO	Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Ovina
CIEF	Contrainmunolectroforesis
CR	Criolla (o)
D. F.	Distrito Federal
DO	Densidad óptica
ELISA	Ensayo inmuno enzimático. <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>

Edo. Mex.	Estado de México
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. <i>Food and Agriculture Organization</i>
FC'	Fijación de complemento
g	Gramos
G-C	Guanina-Citosina
GR	Glóbulos rojos
GRS	Glóbulos rojos sensibilizados
GRT	Glóbulos rojos tanados
IDD	Inmunodifusión doble
Ig ('s)	Inmunoglobulina (s)
IgG	Inmunoglobulina del isotipo G
IgM	Inmunoglobulina del isotipo M
IL	Interleucina
IM	Intramuscular
lb	Libras
LC	colonia grande. <i>Large colony</i>
M	Molar (soluciones molares)
MALP	Lipopéptido activador de macrófagos. <i>Macrophage activating lipopeptide</i>
DMel	Departamento de Microbiología e Inmunología
M-C	Muestras de campo
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad. <i>Major histocompatibility</i>

	<i>complex</i>
ml	Mililitro
mm	Milímetro (s)
MG	Murciana Granadina
MN	La mancha
N	Normal (soluciones normales)
nm	Nanómetros
OIE	Oficina Internacional de Epizootias. <i>Office International des Épizooties</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa. <i>Polimerase chain reaction</i>
pkb	Pares de kilo bases
PCC	Pleuroneumonía contagiosa caprina
PPLO	Organismo de la pleuroneumonía. <i>Pleuropneumoniae organism</i>
R-Ag-Ac	Reacción antígeno-anticuerpo
rpm	Revoluciones por minuto
SSAT	Solución salina amortiguadora con trietanolamina
SAF	Solución amortiguadora de fosfatos
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SC	Colonia pequeña. <i>Small colony</i>
S-C	Suero control
SH	Sistema hemolítico o sistema indicador
SN	Saanen

SNC	Suero normal de conejo
spp.	Las especies de
SSF	Solución salina fisiológica
subsp.	Subespecie
TG	Toggenburh
UC'	Unidad (es) de complemento
UH	Unidad (es) de hemolisina
UI	Unidades internacionales

RESUMEN

CORONA VARGAS JOSÉ LUIS. Estandarización de las pruebas de fijación de complemento y aglutinación indirecta para el diagnóstico de micoplasmosis caprinas asociadas a problemas respiratorios en México (bajo la dirección de Dra. Rosa Elena Miranda Morales y MVZ Esp. Myrna Alicia Vicencio Mallén)

Los problemas respiratorios causados por *Mycoplasma* spp. en los caprinos, causa grandes pérdidas económicas debido a su rápida diseminación y alta mortalidad que presenta, dado que el microorganismo es exigente para su desarrollo *in vitro*, las pruebas serológicas representan una herramienta eficaz para establecer diagnóstico de la enfermedad, razón por la cual se estandarizaron las pruebas de fijación de complemento (FC') y aglutinación indirecta (AI). A partir de una cepa de campo identificada como miembro del grupo *mycoides* se elaboró un antisuero que fue utilizado tanto en la titulación del antígeno (Ag) como control positivo en ambas pruebas. Las muestras de campo procedieron de siete estados de la república mexicana, de algunos de los animales se remitieron muestras para el aislamiento del microorganismo. Los títulos de anticuerpos obtenidos en las pruebas de FC' y AI se relacionaron con los resultados de los aislamientos para determinar el punto de corte, con base en éste se consideraron positivos para FC', títulos \geq a 1/16 y para AI títulos \geq a 1/2. La prueba de FC' mostró una mayor sensibilidad (93.33 %) y especificidad (72.27 %) que la prueba de AI (sensibilidad del 57.69 % y especificidad del 62.91 %), resultando una herramienta mas útil que

Al para el diagnóstico serológico de *Mycoplasma* spp. del grupo *mycoides*, asociados a problemas respiratorios en caprinos de México.

1.0 INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Los micoplasmas son microorganismos procariotes, ubicuos, comensales que afectan a mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces. Aunque son microorganismos con alta especificidad de especie animal, algunas especies de micoplasmas que normalmente afectan a los ovinos se han reportado en los caprinos (Pitcher *et al.*, 2005).

En 1898 Nocard y Roux demostraron que el agente causal de la pleuroneumonía contagiosa bovina era un microorganismo filtrable, al cuál llamaron organismo de la pleuroneumonía (PPLO), esto representó el primer aislamiento de *Mycoplasma* spp. (Bradbury, 2005) y en el año de 1950 se propuso el nombre de *Mycoplasma*, el cual proviene del griego mykes (hongo) y plasma (forma) (Edward *et al.*, 1956).

Hasta los años 70's se consideraban como agentes etiológicos de la pleuroneumonía contagiosa caprina (PCC) a *M. mycoides* subsp. *mycoides* colonia grande (LC) y *M. mycoides* subsp. *capri*, sin embargo, en 1976 MacOwan y Minette establecen a *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* como el único agente causal de la PCC (Nicholas, 2002b).

Los primeros reportes de las especies de micoplasmas consideradas patógenas para los caprinos son: *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* aislado por MacOwan y Minette en 1976 (Rurangirwa *et al.*, 2004); *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC reportado en Chad al Norte de África, en 1962 (Martrenchar *et al.*, 1995); *M. mycoides* subsp. *capri* aislado en 1951 por Longley en Nigeria (Tully *et al.*, 1979);

M. ovipneumoniae por Carmichael *et al.* en 1972 en Nueva Zelanda (Alley *et al.*, 1999); *M. agalactiae* por Bridré y Donatien en 1923 (Tully *et al.*, 1979); *M. capricolum* subsp. *capricolum* por Cordy *et al.*, en 1955 (DaMassa *et al.*, 1987); *M. conjunctivae* y *M. arginini* por Surman y Langford en 1968 y 1971 respectivamente (Tully *et al.*, 1979); y *M. putrefaciens* por Alder *et al.*, en 1956 (Rodríguez *et al.*, 1994).

1.2 Reportes de las micoplasmosis caprinas en México

De Aluja AS (1964) a partir de dos cabras provenientes del estado de Puebla, describe las lesiones de pleuroneumonía contagiosa caprina causada por *Mycoplasma mycoides*, la cual fue confirmada por el aislamiento del microorganismo.

Solana *et al.* (1966), realizaron un estudio epizootiológico en rebaños de 16 estados de la república mexicana, utilizando la prueba de aglutinación directa en placa con antígeno (Ag) completo de *M. mycoides* subsp. *capri*, encontrando una seroprevalencia desde 12 % (Coahuila) y hasta el 79 % (Oaxaca).

Solana *et al.* (1967), aislaron a *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* a partir de dos brotes de neumonía que se presentaron en los estados de Oaxaca y Guerrero.

Ciprian (1977), a partir de pulmones neumónicos de caprinos y ovinos provenientes de cinco rastros de la Ciudad de México aisló *M. arginini*, *M. ovipneumoniae* y cuatro especies de micoplasmas no tipificados.

En 1982 De La Peña M. A. y Valdivieso G. A. a partir de leche de una cabra con mastitis aislaron un micoplasma tipificado por el Dr. Ernø en la Universidad de Aarhus, Dinamarca como un miembro del grupo *mycoides* (Miranda, 1989).

Jaramillo *et al.* (1983), obtuvieron 29 aislados de micoplasmas de pulmones de cabras de rastros del Distrito Federal (D. F.), histológicamente encontraron neumonías proliferativas, exudativas y mixtas, así como pulmones sin cambios aparentes; algunas de las cepas aisladas mostraron una posible reacción cruzada con el serogrupo 6 de Al-Aubaidi (*M. capricolum*).

Otero *et al.* (2004), aislaron a *M. conjunctivae*, *M. putrefaciens*, *M. adleri*, *M. cottewii* y *M. yeatsii* a partir de ácaros provenientes de los conductos auditivos de cabras sacrificadas en rastro.

Hernández *et al.* (2006), a partir de un brote de cuadros respiratorios en Durango aisló una cepa de *Mycoplasma*, la cual fue tipificada como *M. mycoides* subsp. *capri* por medio de pruebas bioquímicas, efectuándose además la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para confirmarlo.

Miranda en 2006¹, aisló e identificó por técnicas moleculares a *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC a partir de cabras con problemas respiratorios, del norte de México.

En marzo de 1999 la entonces Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural ahora SAGARPA, publicó en el Diario Oficial de la Federación el “Acuerdo mediante el cual se enlistan las enfermedades y plagas exóticas y enzoóticas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos”; clasificándolas en 4 grupos, en el Grupo 1 que corresponde a las “enfermedades exóticas que no se encuentran en el territorio nacional y que por su rápida diseminación e impacto económico para la población animal y riesgo para la salud pública son consideradas de notificación obligatoria a las dependencias oficiales de sanidad animal del país” se encuentran la pleuroneumonía contagiosa caprina causada por

¹ Comunicación personal Miranda Morales Rosa Elena

M. capricolum subsp. *capripneumoniae* y la agalactia contagiosa causada por *M. agalactiae* (SAGAR, 1999). Las neumonías y mastitis causadas por otras especies de micoplasmas (principalmente *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC, *M. mycoides* subsp. *capri* y *M. ovipneumoniae*) no están consideradas como micoplasmosis de reporte obligatorio.

Los micoplasmas que afectan a los animales no representan un problema de salud pública, puesto que son altamente específicos de especie. En los humanos la micoplasmosis causada por *M. pneumoniae*, *M. penetrans*, *M. orale* y *M. genitalum* entre otras, están asociadas principalmente a pacientes inmunosuprimidos (Rivera-Tapia *et al.*, 2001; Cedillo *et al.*, 2003; Pitcher *et al.*, 2005).

1.3 Clasificación taxonómica de los micoplasmas caprinos

Reino: Bacteria

Clase: Mollicutes

Orden: Mycoplasmatales

Familia: Mycoplasmataceae

Género: *Mycoplasma*

Especie: *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC, *M. mycoides* subsp. *capri*,
M. capricolum subsp. *capripneumoniae*, *M. ovipneumoniae*, *M. agalactiae*, *M. capricolum* subsp. *capricolum*, *M. conjunctivae*,
M. putrefaciens, *M. arginini*.

Para el género *Mycoplasma* la “List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclatura” (LPSN) reconoce 122 especies (LPSN, 2005), siendo

aproximadamente 85 las que afectan al hombre y a los animales (Whitford *et al.*, 1994).

1.4 Características generales

La principal característica de los micoplasmas es que no poseen pared celular, por lo que no son afectados por los antibióticos β -lactámicos y son sensibles a los detergentes (Rottem, 2003). Están constituidos de una membrana trilaminar compuesta por proteínas, glucoproteínas, glicolípidos, fosfolípidos y esteroides que le proveen la estabilidad osmótica (Wight *et al.*, 1999). Miden de 125 – 250 nm (Brooks *et al.*, 2002), son pleomórficos, es decir, varían de forma, por lo que pueden ser esféricos u ovoides y tienden a formar filamentos delgados ramificados multinucleados, debido a que la fisión binaria del citoesqueleto se puede retrasar con la replicación del genoma (Razin *et al.*, 1998). Generalmente son inmóviles, pero algunas especies muestran un movimiento de deslizamiento; son quimioorganotrofos, utilizan a los azúcares y/o a la arginina como fuente de energía (Holt *et al.*, 1994).

Los micoplasmas pueden teñirse como bacterias Gram negativas, debido a que tienen poca afinidad hacia esta tinción, se recomiendan la de Gimenez y Giemsa para teñir a las bacterias (Brooks *et al.*, 2002); las colonias de micoplasmas se tiñen con los métodos de Giemsa, Castañeda, Dienes y azul de metileno (Wight *et al.*, 1999).

Los micoplasmas poseen un genoma de 600 a 1350 pares de kilobases (pkb), lo que equivale a $\sim 5.0 - 9.0 \times 10^8$ daltons. Su proporción de Guanina-Citosina (G-C)

en el ADN es de 23 – 40 % mol (Whitford *et al.*, 1994). En el análisis de secuencia de aminoácidos de la subunidad 16S del ARN ribosomal (ARNr), se observa que los micoplasmas están relacionados con el género *Clostridium*, por lo que se cree que evolucionaron a partir de éste (Wight *et al.*, 1999). Una característica del género *Mycoplasma* es que inicia la síntesis de proteínas con el codón UGA que codifica al triptofano (aminoácido de inicio), mientras que para otros géneros bacterianos este mismo codón está considerado como codón de señal de término para la síntesis de proteínas (Holt *et al.*, 1994).

En 1987 Cottew *et al.*, demostraron que algunas especies de micoplasmas están relacionadas filogenéticamente entre sí, siendo clasificadas dentro del mismo grupo por sus características, un ejemplo de esto es el “grupo *mycoides*”, esta relación la probaron con pruebas bioquímicas convencionales, reacciones inmunológicas, hibridación del ADN, análisis de la secuencia de genes de la subunidad 16S del ARNr mediante la técnica de PCR (Thiaucourt *et al.*, 2000; Nicholas, 2002a), debido a esto, la identificación de estas especies se dificulta ya que no pueden ser diferenciados bioquímicamente, además de presentar reacción cruzada con antisueros policlonales dirigidos contra los diferentes miembros del grupo (Taylor *et al.*, 1992), ya que algunas de las proteínas inmunodominantes son compartidas por los miembros del grupo *mycoides*, por ejemplo la proteína hsp60 y la lipoproteína p62 (March *et al.*, 2002). Las especies que conforman el “grupo *mycoides*” son: *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC, *M. mycoides* subsp. *mycoides* colonia pequeña (SC), *M. mycoides* subsp. *capri*, *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae*, *M. capricolum* subsp. *capricolum* y *Mycoplasma* spp. serogrupo 7 bovino (Bölske *et al.*, 1996); recientemente *M. putrefaciens* también ha sido

clasificada dentro del grupo *mycoides* por su estudio del ARN 16S (Peyraud *et al.*, 2003).

1.5 Características de cultivo

Los micoplasmas son los procariotes más pequeños capaces de reproducirse en vida libre a diferencia de los virus, chlamydias y rickettsias que están obligados a parasitar a una célula del huésped para su replicación (Bradbury, 2005).

Para su desarrollo *in vitro* los micoplasmas requieren de esteroides que son proporcionados al adicionar suero tanto a los medios de cultivo líquidos como a los sólidos (Holt *et al.*, 1994); en ambos casos se utiliza una base de peptona con infusión de corazón, enriquecida con glucosa, extracto de levadura y con un pH de 7.5 (Brooks *et al.*, 2002; Martrenchar *et al.*, 1995). El tiempo de incubación varía de 3 hasta 30 días en condiciones de microaerobiosis (5 % CO₂) a 37 °C (Wight *et al.*, 1999). En el medio líquido el desarrollo de los micoplasmas se hace evidente por la presencia de turbidez y acidificación del medio que es detectada por el indicador de pH, rojo de fenol (Whitford *et al.*, 1994). En los medios sólidos las colonias son muy pequeñas (generalmente menores a 1 mm de diámetro), caracterizándose por que el centro de la colonia tiende a introducirse en el agar, dándoles la apariencia típica de “huevo frito” (Holt *et al.*, 1994).

1.6 Factores de virulencia

Los micoplasmas tienen predilección por las mucosas respiratorias, oculares y genitales. Generalmente establecen una infección superficial persistente; cuando

se presenta la diseminación sistémica se afectan las membranas serosas de la cavidad torácica, abdominal y articular, manifestándose la enfermedad clínica, aguda o crónica y en algunas ocasiones se puede presentar un periodo de latencia (Biberstein *et al.*, 1990).

La adherencia es el primer paso en la patogénesis de los micoplasmas, la cual se lleva a cabo por medio de adhesinas (GapA, CrmA), la proteína integral de membrana PvpA con función de hemoaglutinina, la lipoproteína pMGA (Bradbury, 2005) y la cápsula que poseen algunas especies de micoplasmas (Biberstein *et al.*, 1990), además de mecanismos alternos (lípidos modificados y proteínas de membrana) para adherirse a los eritrocitos (hemoadsorción) (Razin *et al.*, 1998).

Los micoplasmas producen potentes toxinas que ocasionan alteraciones en la integridad de las células del huésped, así como peróxidos, superóxidos, enzimas hidrolíticas como fosfolipasas, ureasas, proteasas, hemolisinas y nucleasas (Razin *et al.*, 1998), así mismo, los micoplasmas compiten por aminoácidos, ácidos grasos, cofactores y vitaminas, alterando la integridad y funcionamiento de las células del huésped (Rottem, 2003).

1.7 Respuesta inmune contra los micoplasmas

Los micoplasmas poseen potentes inumoduladores como el lipopéptido activador de macrófagos (MALP), los cuales tienen la capacidad de activar monocitos, macrófagos, linfocitos T y B, lo que induce la liberación de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral- α , interleucina (IL)-1, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-13 así como la expresión de las moléculas del complejo mayor de

histocompatibilidad (MHC) clase I y II. Además incrementa la citotoxicidad de macrófagos, células NK, linfocitos T y activa la cascada del complemento (C') tanto por la vía clásica como por la alterna (Rottem, 2003; Bradbury, 2005; Pitcher *et al.*, 2005; Niag *et al.*, 1997).

Durante la interacción de los micoplasmas con las células del sistema inmune, se ha observado que al inducir la producción de IL-10 e IL-13 estimulan la producción de IgG1 e IgE por parte de los linfocitos B; inhiben tanto las funciones de los macrófagos en la producción de citocinas proinflamatorias como la proliferación de células T y producen un desbalance entre los linfocitos Th1 y Th2 (Razin *et al.*, 1998). Los micoplasmas tienen la habilidad para presentar cambios en el fenotipo, resultando en una variabilidad antigénica de algunos componentes de la membrana, además comparten epítomos con las células del huésped, dando como resultado la evasión de la respuesta inmune y/o inducción en la producción de auto-anticuerpos por la activación de linfocitos T y B autoreactivos (Bradbury, 2005; Rottem, 2003; Razin *et al.*, 1998).

1.8 Enfermedades causadas por *Mycoplasma* spp., en los caprinos

Los caprinos son afectados por nueve especies del género *Mycoplasma* de las cuales, cuatro están involucradas en enfermedades respiratorias: *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC, *M. mycoides* subsp. *capri*, *M. ovipneumoniae* y *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae*. Las otras cinco especies: *M. agalactiae*, *M. putrefaciens*, *M. capricolum* subsp. *capricolum*, *M. conjunctivae* y *M. arginini* son

causantes de cuadros de mastitis, artritis y queratoconjuntivitis. Algunas especies pueden ocasionar tanto neumonías como mastitis, tal es el caso de: *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC, *M. mycoides* subsp. *capri* y *M. capricolum* subsp. *capricolum* (Bergonier *et al.*, 1997; Nicholas, 2002a).

El periodo de incubación de la micoplasmosis respiratoria es de aproximadamente 10 días, pero puede variar de 2 a 28 días, afectando cabras de todas las edades y de ambos sexos. En las neumonías asociadas a infecciones por micoplasmas, las cabras clínicamente pueden presentar postración, pirexia, anorexia, atonía ruminal, disnea, dolor constante con episodios de tos, por lo que adoptan una posición con los miembros en abducción y el cuello estirado, salivación y descarga nasal mucopurulenta, en los estadíos finales, las cabras son incapaces de moverse y le sigue una muerte rápida asociada a la insuficiencia respiratoria; en las formas subagudas y crónicas, los signos son moderados con tos que sólo se observa después de que los animales hacen ejercicio (Nicholas, 2002b). Los altos índices de morbilidad causados por micoplasmas son favorecidos debido a que presentan varias vías de transmisión, siendo las más comunes los aerosoles, el calostro y la leche de animales infectados (Pugh, 2002).

M. capricolum subsp. *capripneumoniae*, es el agente etiológico de la pleuroneumonía contagiosa caprina (exótica en México), esta enfermedad representa una de las mayores pérdidas económicas en África y Asia debido a la rápida diseminación que presenta (Bölske *et al.*, 1996), por lo que está considerada dentro de la Lista de enfermedades de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) (OIE, 2007). La PCC alcanza una mortalidad del 60 % al 80 %, con una morbilidad del 80 % al 100 % (Rurangirwa *et al.*, 2004), por lo que es necesario un control rápido

de la enfermedad que involucre tratamiento adecuado sobre todo en etapas tempranas del brote. A la necropsia todos los lóbulos pulmonares están aumentados de tamaño, son firmes al tacto, lo cual puede observarse unilateral o bilateralmente; en la cavidad torácica se encuentra abundante líquido amarillento. Generalmente se presenta una pleuritis fibrinosa que se extiende por toda la superficie pulmonar, ocasionalmente se puede observar pericarditis (Pugh, 2002). Esporádicamente se ha observado que puede producir mastitis y poliartritis (Jones *et al.*, 1988).

M. mycoides subsp. *mycoides* LC y *M. mycoides* subsp. *capri* generalmente presentan brotes muy similares de enfermedades respiratorias en caprinos, pueden llegar a ocasionar una morbilidad del 100 % y una mortalidad del 50 %. Es común que *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC produzca una septicemia que termine en poliartritis y mastitis, mientras que *M. mycoides* subsp. *capri* se restringe a la cavidad torácica y puede o no ocasionar septicemia seguida de muerte (Martrenchar *et al.*, 1995; Nicholas, 2002b; Rurangirwa *et al.*, 2004). Las cabras adultas típicamente presentan pleuroneumonía, mastitis y poliartritis, mientras que los signos comunes en los cabritos son la septicemia, meningitis y artritis. A la necropsia se observa pleuroneumonía, neumonía intersticial, consolidación unilateral, adherencias pleurales, pleuritis, acumulación de líquido pleural que puede volverse gelatinoso cubriendo al pulmón, estas lesiones se observan principalmente en los lóbulos apical, cardiaco y diafragmático (Pugh, 2002; Nicholas, 2002b).

M. ovipneumoniae se considera el agente primario de la neumonía enzoótica, también conocida como “neumonía crónica no progresiva” y “neumonía atípica”,

afecta principalmente a los ovinos, no obstante también se ha reportado en las cabras. En las infecciones por *M. ovipneumoniae* en los caprinos, se ha observado la asociación de agentes patógenos secundarios como *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, infecciones virales como Parainfluenza 3, Adenovirus y/o Reovirus (Jones *et al.*, 1988). A la necropsia se observa pleuresía fibrinopurulenta, pericarditis con líquido amarillento en el saco pericárdico, pulmones consolidados particularmente la porción craneoventral de los lóbulos y puede extenderse hasta un 70 % o más de la superficie pulmonar. La enfermedad presenta una alta morbilidad y una mortalidad del 20 %. (Nicholas, 2002a; Jones *et al.*, 1988).

En los caprinos, otras especies de micoplasmas como *M. agalactiae*, *M. capricolum* subsp. *capricolum*, *M. conjunctivae*, *M. putrefaciens* y *M. arginini*, están involucradas en cuadros de mastitis, artritis, queratoconjuntivitis, septicemia y ocasionalmente abortos (Assunção *et al.*, 2004; Giacometti *et al.*, 1998; Peyraud *et al.*, 2003; Cho *et al.*, 1975).

1.9 Diagnóstico

Debido a los altos índices de morbilidad (hasta del 100 %) y mortalidad (hasta del 80 %) que se presentan por las neumonías causadas por los micoplasmas, es de gran importancia realizar un diagnóstico eficaz y rápido, para establecer un tratamiento y las medidas sanitarias necesarias para evitar que la enfermedad se disemine tanto dentro del rebaño como fuera de éste (Rurangirwa *et al.*, 2004).

El diagnóstico se basa principalmente en los signos clínicos y lesiones a la necropsia, sin embargo, es muy importante confirmarlo con pruebas de laboratorio

como las bacteriológicas y serológicas. El diagnóstico bacteriológico tiene como finalidad el aislamiento e identificación del microorganismo, por lo que se debe tener cuidado con el tipo de muestra que se toma y envía. En el caso de afección del aparato respiratorio las muestras indicadas son pulmón, líquido pleural y/o secreciones nasales, las cuales deben tomarse asépticamente, posteriormente la muestra debe enviarse al laboratorio en congelación o en medio de cultivo Hayflick en refrigeración a 4 – 8 °C (Nicholas, 2002b).

Para la identificación del género se utilizan pruebas como la reversión de formas L, morfología de la colonia y requerimientos de esterol. La determinación de las especies se realiza con pruebas bioquímicas como la utilización de la glucosa y manosa; hidrólisis de la arginina, urea y gelatina; actividad de la fosfatasa, producción de películas y manchas, producción del tetrazolio en aerobiosis y anaerobiosis; digestión del suero coagulado y la caseína; así como la hemoadsorción, todas estas pruebas bioquímicas no permiten diferenciar las especies del grupo *mycoides*, por lo que es necesaria la serotipificación mediante pruebas como inhibición del crecimiento y del metabolismo, la inmunofluorescencia directa e indirecta, la inmunodifusión doble y electroforesis bidimensional (Whitford *et al.*, 1994; Holt *et al.*, 1994; Ayling *et al.*, 2004). La técnica de la PCR que es sensible y específica, ayuda a la tipificación de las especies de micoplasmas, por lo que es útil para la identificación de las especies del grupo *mycoides* (Bölske *et al.*, 1996).

El diagnóstico serológico se basa en la detección de anticuerpos (Ac's) específicos presentes en el suero, los cuales reconocen a un Ag formando una reacción antígeno anticuerpo (R-Ag-Ac). Los niveles de Ac's permiten determinar evaluar la

exposición al antígeno en una población. Para poder obtener un resultado confiable es importante el buen manejo de la muestra tanto en el momento del sangrado como en su envío al laboratorio, ya que una muestra hemolizada o contaminada puede alterar el resultado de la prueba. Las pruebas serológicas se dividen en tres categorías: 1) Pruebas de unión primaria, miden directamente la R-Ag-Ac por medio de radioisótopos, colorantes fluorescentes o marcadores enzimáticos, ejemplo de estas es el ensayo inmunoenzimático (ELISA) y el radioinmunoanálisis (RIA); 2) Pruebas de unión secundaria, en las cuales la R-Ag-Ac va seguida de una segunda reacción como precipitación, aglutinación o lisis celular, dentro de estas se encuentra inmunodifusión doble (IDD), aglutinación directa e indirecta y fijación de complemento (FC'); 3) Pruebas de unión terciaria miden directamente el efecto protector de los anticuerpos en un sistema vivo como en el caso de las pruebas de neutralización (Tizard, 1998). Para el diagnóstico de micoplasmosis las pruebas utilizadas son fijación de complemento, aglutinación indirecta (AI) y el ensayo inmuno enzimático competitivo e indirecto. Dentro de las ventajas que presentan estas pruebas serológicas se encuentra la de ser rápidas, pues permiten conocer el resultado en un día, además de no requerir una infraestructura costosa (March *et al.*, 2000).

La OIE establece la prueba de FC' como prueba oficial para el diagnóstico de la pleuroneumonía contagiosa caprina (OIE, 2007). Esta prueba es la más utilizada para la detección de Ac's contra *Mycoplasma* spp. en caso de afecciones respiratorias en los pequeños rumiantes, ya que permite detectar infecciones en fase aguda de la enfermedad con pocas reacciones falsas positivas (Jones, 1990). Así mismo, puede detectar inmunoglobulinas (Ig) del isotipo IgG en suero a

concentraciones muy bajas (0.01-0.1 $\mu\text{g/ml}$) (Muthomi *et al.*, 1983), desde el día 20 \pm 4 hasta por 4 meses post-infección experimental (Paling *et al.*, 1978; March *et al.*, 2000; Rurangirwa *et al.*, 1987).

La prueba de FC' se basa en la activación del complemento por la vía clásica, para ello se puede utilizar como Ag tanto células completas de micoplasmas, como sometidas a sonicación o congelaciones y descongelaciones simultáneas (Muthomi *et al.*, 1983; March *et al.*, 2000; Jones, 1990).

La prueba de AI se basa en la unión de un Ag a partículas inertes como glóbulos rojos (GR) o látex, siendo las mejores partículas transportadoras los GR (Tizard, 1998). La AI no está considerada por la OIE como prueba oficial, sin embargo es utilizada principalmente en África para la detección de Ac's contra *Mycoplasma* spp. ya que ha mostrado una mayor sensibilidad (Nicholas, 2002b; March *et al.*, 2000; Rurangirwa *et al.*, 1987). La prueba tiene la capacidad de detectar 0.005 $\mu\text{g/ml}$ de Ac, de los isotipos IgM e IgG (Muthomi *et al.*, 1983). Se ha observado que en cabras inoculadas experimentalmente por vía endotraqueal, se han detectado Ac a partir del día 8 – 12 post-infección (Cho *et al.*, 1975). Para la prueba, el Ag puede adherirse a GR de ovino para detectar Ac's en suero o bien puede fijarse a partículas de látex en cuyo caso se detectan Ac's ya sea en suero o en sangre completa. (Rurangirwa *et al.*, 1987; Muthomi *et al.*, 1983; Jones, 1990).

La prueba de ELISA (no ésta considerada por la OIE como prueba oficial) se ha utilizado para el diagnóstico de *Mycoplasma* spp. en los caprinos. Los métodos de ELISA más empleados son el indirecto y el competitivo con Ag sonicado (Assunção *et al.*, 2004). Se ha observado que son comunes las reacciones falsas positivas

mostrando una baja especificidad, esta desventaja se ha logrado eliminar con el uso de un conjugado monoclonal. Con esta prueba se detectan IgG desde los días 35 – 40 y hasta 13 meses después de la inoculación experimental por vía subcutánea y endotraqueal (March *et al.*, 2002; Bergonier *et al.*, 1997).

1.10 Tratamiento

Debido a que los micoplasmas carecen de pared celular no son afectados por los β -lactámicos y son sensibles a los antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas como la oxitetraciclina (tetraciclina), tilosina (macrólido), estreptomina (aminoglucósido) y lincomicina (lincosamida), también se ha reportado la susceptibilidad a la enrofloxacin (quinolona) que actúa a nivel de ácidos nucleicos (Pugh, 2002; Sumano *et al.*, 1997; Rurangirwa *et al.*, 2004; Fox *et al.*, 2005). El establecer un tratamiento favorece el control de la enfermedad, sin embargo, algunos animales pueden quedar como portadores sanos, lo que dificulta la erradicación de la enfermedad del rebaño (Nicholas, 2002b).

1.11 Profilaxis y control

En los países donde la enfermedad es enzoótica, se inmuniza a los animales como medida profiláctica. Las bacterinas más utilizadas son las compuestas con Ag's de micoplasmas, sonicados y emulsificados con adyuvante incompleto de Freund y las elaboradas con *Mycoplasma* inactivado y liofilizado. La inmunización se puede realizar en los cabritos a partir de las 10 semanas de edad, para evitar la interferencia con los Ac's maternos (Nicholas, 2002b).

En los países o regiones donde se presentan brotes de *Mycoplasma* spp., se restringe el movimiento de animales enfermos o que hayan tenido contacto con éstos, cuando el brote ha alcanzado dimensiones de epidemia se puede recurrir al sacrificio de los animales (Nicholas, 2002b).

Es recomendable que en los rebaños libres de micoplasmosis y en los que se haya logrado controlar la enfermedad, se empleen medidas de control como la restricción de entrada de animales nuevos al rebaño con la finalidad de mantener el control natural de la enfermedad (Rurangirwa *et al.*, 2004).

2.0 HIPÓTESIS

La prueba de fijación de complemento directa es más específica y viable de utilización por los laboratorios que la prueba de aglutinación indirecta para el diagnóstico serológico de micoplasmosis caprinas asociadas a problemas respiratorios en México.

3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Estandarizar las pruebas de fijación de complemento directa y aglutinación indirecta para el diagnóstico de las micoplasmosis caprinas asociadas a problemas respiratorios en México.

3.2 Objetivos específicos

- 3.2.1 Elaborar antígeno de *Mycoplasma* spp.
- 3.2.2 Elaborar antisueros contra *Mycoplasma* spp.
- 3.2.3 Estandarizar los elementos de la prueba de fijación de complemento
- 3.2.4 Estandarizar los elementos de la prueba de aglutinación indirecta
- 3.2.5 Procesar muestras de campo con las pruebas de FC' y AI
- 3.2.6 Determinar la sensibilidad y especificidad de las pruebas serológicas de fijación de complemento y aglutinación indirecta

4.0 MATERIAL Y MÉTODOS

Para la elaboración del antígeno se utilizó una cepa de *Mycoplasma* spp.¹, perteneciente al cepario del Laboratorio de Micoplasmas del Departamento de Microbiología e Inmunología (DMel) de la FMVZ-UNAM, la cual fue aislada de pulmón de cabra con neumonía.

4.1 Elaboración de antígeno concentrado de *Mycoplasma* spp.

En 2 ml medio líquido Hayflick (Jasper, 1981) (Apéndice 1) se sembraron 200 µl de cultivo de 24 hrs de la cepa y se incubó² a 37 °C por 24 – 72 horas, al observar la acidificación del medio se sembró en placas de Hayflick sólido (Apéndice 1 bis), incubándose éstas en microaerobiosis a 37 °C por 48 horas para permitir el desarrollo de las colonias, la morfología típica de *Mycoplasma* spp. se observó con el microscopio estereoscópico³. A partir de una colonia se elaboró el antígeno, con base en la metodología descrita por Tully *et al.* (1983); utilizando una solución amortiguadora de fosfatos (SAF) pH⁴ 7.2 (Apéndice 2); el Ag fue lavado por 3 ocasiones, centrifugándolo⁵ a 15 000 rpm durante 45 minutos y eliminando el sobrenadante, después del último lavado la pastilla fue resuspendida (Cuadro 1). Este proceso se realizó para obtener 30 ml de Ag concentrado.

¹ Identificada como del grupo *mycoides* por medio de pruebas bioquímicas y PCR
Gentilmente proporcionada por la Dra. Rosa Elena Miranda Morales

² Incubadora FORMA SCIENTIFIC

³ Microscopio estereoscópico ZEISS

⁴ Potenciómetro COLE-PARMER

⁵ Ultracentrífuga refrigerada BECKMAN

4.2 Elaboración de antisueros contra *Mycoplasma* spp.

Para la elaboración de los antisueros se utilizaron conejos¹ raza Nueva Zelanda variedad blanco, hembras, no gestantes, de 2 Kg de peso, previo a la inmunización se les realizó un sangrado basal para verificar que no tuvieran anticuerpos contra *Mycoplasma* spp., utilizando las pruebas de inmunodifusión doble y contraelectroforesis (CIEF).

Los protocolos de inmunización utilizados fueron los descritos por Tully *et al.* (1983) (Cuadro 2) y el descrito por Morilla *et al.* (1986), en ambos casos se inocularon en total 5.2 ml de Ag concentrado.

La seroconversión se evaluó utilizando las pruebas de IDD y CIEF en los tiempos especificados para cada protocolo. Debido a que las dos pruebas requieren Ag soluble, aparticulado y a nivel molecular, se realizaron congelaciones y descongelaciones simultáneas del Ag de *Mycoplasma* spp., por un mínimo 20 veces (Tizard, 1996).

Para la prueba de IDD se utilizó como medio de soporte agar noble al 1%, siguiendo un patrón de pozos periféricos y uno central como se muestra en el Esquema 4.1, dejándose incubar por 24 horas a temperatura ambiente (Morilla *et al.*, 1986).

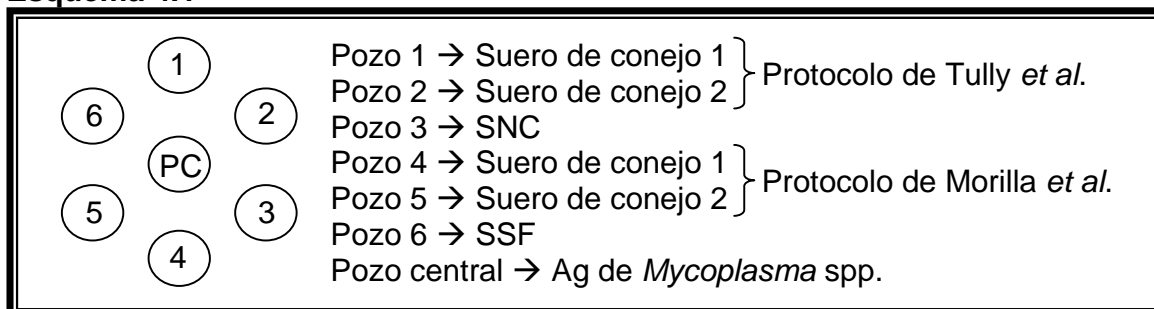
La prueba de CIEF se realizó en agarosa al 1%, la distribución de los sueros se muestra en el Esquema 4.2. Utilizando una solución amortiguadora de Tris ácido acético glacial 0.05 M pH 8.0, al Ag se le realizó un precorrido a 100 Volts² durante 30 minutos, al término de los cuales se colocaron los sueros problema, suero

¹ Aprobado el 15 de agosto de 2005 por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación (CICUAE)

² Fuente de poder HEAT KIT

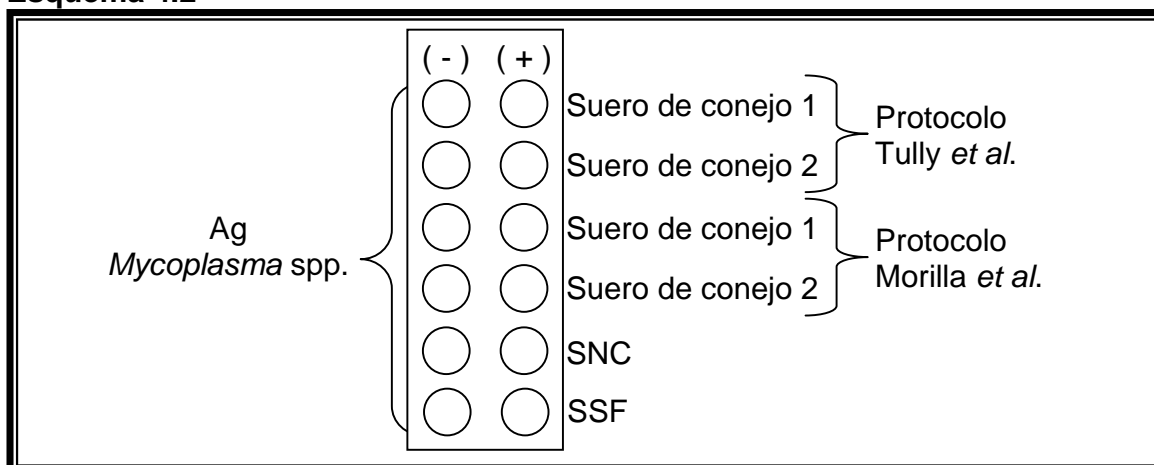
normal de conejo (SNC) y solución salina fisiológica (SSF) como control de Ag con la finalidad de detectar reacciones inespecíficas de éste, y se corrió a 200 volts por 60 minutos. Posteriormente se dejó la prueba a temperatura ambiente durante toda la noche en cámara húmeda (Morilla *et al.*, 1986).

Esquema 4.1



Descripción de la disposición de los pozos para la prueba de IDD, se utilizó SSF para el control del Ag, en el pozo central se colocó Ag soluble del mismo lote del utilizado en las inmunizaciones.

Esquema 4.2



Descripción de la disposición de los pozos para la prueba de CIEF, los sueros, SNC y SSF se colocaron en los pozos del polo (+) y en los del polo (-) Ag soluble del mismo lote del utilizado en las inmunizaciones.

Una vez que se observó una reacción intensa en ambas pruebas se procedió a la obtención del antisuero (Apéndice 3), para lo cual los conejos se sangraron en blanco, el manejo de los animales se realizó con base en la Norma Oficial Mexicana “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio” (NOM-062-ZOO-1999). Una vez obtenido el antisuero se

inactivó a 60 °C por 30 minutos en baño serológico¹ y se fraccionó en viales de 1 ml, los cuales fueron conservados a –20 °C² hasta su utilización.

4.3 Reacción cruzada de *Mycoplasma* spp.

Dado que en éste trabajo se utilizó Ag del grupo *mycoides* y su respectivo antisuero, se probaron Ag's y antisueros de Mollicutes que no pertenecieran al grupo *mycoides*; para ello se elaboró Ag concentrado de *Mycoplasma bovis*, *Acholeplasma laidlawii* y *Ureaplasma diversum*, los cuales se probaron con las pruebas de IDD y CIEF utilizando el antisuero elaborado de *Mycoplasma* spp. del grupo *mycoides*; el Ag del grupo *mycoides* se trabajó con las pruebas de FC' y AI con antisueros contra *M. bovis*³ y *M. hyopneumoniae*⁴.

4.4 Determinación de las características del antígeno para las pruebas de FC' y AI

Para determinar el tipo de Ag para las pruebas de FC' y AI, se probaron los antisueros y un lote piloto de 71 muestras de campo (M-C) con tres variantes del Ag: completo, sonicado y soluble.

Como Ag completo se utilizaron células completas de *Mycoplasma* spp., las cuales fueron resuspendidas a partir del concentrado.

¹ Baño serológico PRECISION SCIENTIFIC CO.

² Congelador REVCO

³ Proporcionado por la Dra. Rosa Elena Miranda Morales

⁴ Proporcionado por el MVZ Daniel Atilano López

EL Ag sonicado¹ se elaboró siguiendo la metodología descrita por Thirkill *et al.* (1974) (Apéndice 4).

El Ag soluble se obtuvo por medio de un mínimo de 20 congelaciones y descongelaciones simultáneas (Jones, 1990).

Para determinar si hay diferencia estadística entre los tres tipos de Ag's se utilizó una prueba de homogeneidad de Xi cuadrada, para ello los títulos obtenidos de los sueros, se transformaron en Logaritmo base 2 (Daniel, 2002).

4.5 Estandarización de los elementos de la prueba de fijación de complemento

Para el proceso de titulación de los elementos y la realización de la prueba de FC' se utilizó solución salina amortiguadora con trietanolamina (SSAT) (Apéndice 5) (Díaz *et al.*, 2001).

4.5.1 Sistema hemolítico

El sistema hemolítico (SH) o sistema indicador es una R-Ag-Ac compuesta por 2 unidades de hemolisina (UH) y una suspensión de GR de ovino al 2 % en proporción 1:1.

4.5.1.1 Elaboración de hemolisina

La hemolisina es un antisuero contra los receptores de membrana de los eritrocitos, para su elaboración se seleccionaron 20 ovinos adultos clínicamente

¹ Sonicador COLE-PARMER

sanos, de los cuales se obtuvieron 20 ml de sangre por vía yugular, utilizando anticoagulante Alsever (Apéndice 6), para esto se contó con el apoyo del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Ovina (CEIEPO) de la FMVZ-UNAM.

El proceso obtención de las membranas de los eritrocitos (estroma) fue con base en lo descrito por la FAO (FAO, 1984). La prueba de esterilidad se realizó utilizando agar sangre, caldo biotriptasa y caldo tioglicolato, los cuales se incubaron a 37 °C por 24 hrs para descartar contaminación bacteriana; y agar sabouraud para contaminación micótica, se incubó a temperatura ambiente (20 – 25 °C) por 7 días. Se utilizaron 2 conejos raza Nueva Zelanda variedad blanco, hembras, no gestantes, de 2 Kg de peso, los cuales fueron inmunizados con el estroma según el calendario descrito por la FAO (1984). A partir de la tercera inoculación se tomaron muestras de sangre sin anticoagulante para evaluar la seroconversión (Cuadro 3).

El sangrado en blanco de los conejos se realizó cuando se obtuvo el máximo título de la hemolisina. Una vez obtenido el suero, se inactivó y almacenó con glicerina al 50 %, en congelación a –20 °C hasta su uso.

4.5.1.2 Suspensión de glóbulos rojos de ovino al 2 %

Para la preparación de la suspensión de glóbulos rojos al 2 %, los eritrocitos fueron obtenidos de animales clínicamente sanos y se almacenaron con Alsever en refrigeración¹. Los GR fueron lavados 3 veces con SSAT (Apéndice 7),

¹ Refrigerador AMERICAN HUSSMANN

obtenido el paquete se preparó una suspensión al 2 % con SSAT, para corroborar la concentración de los GR se midió la densidad óptica (DO) en un espectrofotómetro¹ a una longitud de onda de 540 nm de luz visible (Díaz *et al.*, 2001).

4.5.2 Obtención del complemento

Se utilizó el complemento de suero de cobayo, ya que tiene una mayor actividad hemolítica que el de otras especies (Hill, 1976). Para su obtención se sangraron en blanco (NOM-062-ZOO-1999) 6 cobayos de 500 g de peso, machos o hembras no gestantes, en buen estado nutricional.

El C' obtenido fue fraccionado en viales con 0.5 ml y 0.25 ml; manteniéndose en congelación a -20 °C sin inactivar.

4.5.3 Titulación de hemolisina y complemento

La titulación de estos elementos se realiza al mismo tiempo, ya que la actividad biológica de ambos está íntimamente relacionada, para ello se utilizó el método descrito por Cunningham (1971) modificado.

Se realizó una dilución 1/100 de la hemolisina, a partir de la cual se hicieron diluciones en pasos y seriadas para obtener el siguiente esquema:

1/5 000	1/10 000	1/20 000		
1/3 000	1/ 6 000	1/12 000		
1/1 000	1/ 2 000	1/ 4 000	1/8 000	1/16 000

¹ Espectrofotómetro PERKIN ELMER U.S.A.

A todas las diluciones se les agregó 0.4 ml de SSAT, 0.2 ml complemento de cobayo previamente diluido 1/20 y 0.2 ml de GR ovino al 2 %.

En la misma gradilla se colocaron 10 tubos a los que se les agregó C' diluido 1/20 en las siguientes cantidades:

0.02	0.04	0.06	0.08	0.10	0.12	0.14	0.16	0.18	0.20
ml	ml	ml	ml	ml	ml	ml	ml	ml	ml

A los tubos de complemento se les agregó SSAT c.b.p. 0.6 ml y se incubó toda la gradilla en baño maría¹ a 37 °C por 60 minutos, a los 30 minutos se realizó la lectura de la hemolisina buscando el título, el cual es la dilución más alta en la que se observa el 100 % de hemólisis y en donde se encuentra una unidad de hemolisina.

Una vez obtenido el título de la hemolisina, se preparó el sistema hemolítico con 2 UH y se incubó por 30 minutos en baño maría a 37 °C junto con los tubos de C'. Al término de la incubación se agregaron 0.4 ml de SH a los tubos de C' y se incubaron por 30 minutos más.

La lectura del C' se realizó buscando el tubo con menor cantidad de complemento y el 100 % de hemólisis que indica una unidad de complemento (UC').

4.5.4 Titulación del antígeno de *Mycoplasma* spp.

Es importante determinar la concentración adecuada de Ag para evitar un fenómeno de zona que impida observar la diferencia entre las reacciones positivas

¹ Baño serológico BOCHEL

y negativas, para ello se tituló el Ag utilizando una modificación del método descrito por Hill (Alton, 1976).

Para la titulación del Ag se realizaron diluciones desde 1/100 hasta 1/600, cada dilución se enfrentó tanto al suero control (S-C) positivo (+) y negativo (-). La prueba incluyó los controles anticomplementarios (antic') para cada suero y los correspondientes a los otros elementos como se muestra a continuación:

S-C (+)						Antic' (+)		S-C (-)		Antic' (-)		Controles			
1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/5	1/10	1/5	1/10	1/5	1/10	Ag-C'	C'	Ag	SH
0.2 ml												0.4	0.2	0.2	0.6
Volumen final												ml de SSAT			

A las diluciones de suero (+) y (-), Ag-C' y C' se les agregó 0.2 ml de Ag; a los controles antic' se les agregó 0.2 ml de SSAT. Posteriormente se agregaron 0.2 ml con 2 UC' excepto a las columnas de los controles de Ag y SH. Los tubos se incubaron en baño maría a 37 °C por 60 minutos junto con el SH. Posteriormente se agregó 0.4 ml del sistema hemolítico a todos los tubos de la gradilla y se incubó por 30 minutos más. La dilución del Ag que se seleccionó fue aquella en la cual se observó una clara diferencia entre una reacción positiva y una negativa, así como la reacción esperada en cada uno de los controles.

4.5.5 Titulación de los antisueros contra *Mycoplasma* spp.

Los antisueros elaborados fueron utilizados como control positivo en la prueba de FC', se procesaron con la metodología descrita en el numeral 4.8.1, para determinar el título de cada antisuero.

4.6 Estandarización de los elementos de la prueba de aglutinación indirecta

4.6.1 Obtención de glóbulos rojos de ovino

Los eritrocitos fueron obtenidos de 4 ovinos sanos, la toma de la muestra se realizó con anticoagulante Alsever por vía yugular y se conservaron en refrigeración hasta su utilización, por un periodo no mayor a 15 días (Hill, 1963).

4.6.2 Fijado de los glóbulos rojos de ovino

Se realizó una suspensión de glóbulos rojos de ovino al 2.5 % (previamente lavados) con SAF pH 7.2. Esta suspensión fue mezclada en volúmenes iguales con glutaraldehído al 1 %. La mezcla se mantuvo en agitación¹ constante a temperatura ambiente (20 – 25 °C) hasta que los GR tomaron una coloración café. Una vez fijados los GR se lavaron tres veces con SAF pH 7.2 y posteriormente se realizó una suspensión al 2.5 % en SAF pH 7.2. La suspensión se guardó en refrigeración hasta su uso (Morilla *et al.*, 1986; Lam *et al.*, 1974).

¹ Platina LINDBERG

4.6.3 Tanado de los glóbulos rojos de ovino fijados

La suspensión de GR fijados se mezcló con un volumen igual de ácido tánico diluido 1/20 000, la mezcla se incubó a 37 °C durante 10 minutos en baño maría, al término de ésta los glóbulos rojos se lavaron tres veces con SAF pH 7.2. Con el paquete obtenido se realizó una suspensión de GR tanados al 2.5 % en SAF pH 6.4 (Apéndice 2). Esta suspensión se refrigeró a 4 °C hasta su uso (Morilla *et al.*, 1986; Muthomi *et al.*, 1983).

4.6.4 Sensibilización de glóbulos rojos de ovino tanados

En SAF pH 6.4 se realizó la dilución del Ag que fue determinada como óptima en la titulación (descrita en el numeral 4.5.5) la cual se mezcló en proporción 1:1 con la suspensión de glóbulos rojos tanados al 2.5 % y se incubó a 37 °C por 15 minutos en baño maría. La mezcla se centrifugó para lavar los eritrocitos 2 veces con SAF pH 7.2 y posteriormente se realizó un tercer lavado con SAF pH 7.2 con 1 % de suero normal de conejo (Apéndice 2), previamente inactivado y adsorbido (Apéndice 8). A partir del paquete se preparó la suspensión de trabajo de GR sensibilizados al 0.75 – 1.5 % en SAF pH 7.2, con 1 % de SNC. La sensibilización se realizó el mismo día en que se trabajaron las muestras (Morilla *et al.*, 1986; Muthomi *et al.*, 1983).

4.6.5 Titulación del antígeno de *Mycoplasma spp.*

Al igual que para la prueba de fijación de complemento, se determinó la concentración adecuada del Ag para AI, para ello se sensibilizaron GR tanados

con diferentes concentraciones de Ag, las cuales fueron probadas tanto con el suero control (+) (antisuero elaborado) como con el suero control (-) de conejo. La dilución del Ag considerada óptima fue aquella en la cual el S-C (+) presentó el mayor título, a la vez que en el S-C (-) no se observó aglutinación (Morilla *et al.*, 1986).

4.6.6 Titulación de los antisueros contra *Mycoplasma* spp.

Los antisueros elaborados también se utilizaron como control positivo en la prueba de AI, se trabajaron con la técnica descrita en el numeral 4.8.2 para determinar su título.

4.7 Determinación del tamaño de la muestra

Para determinar el tamaño de muestra se utilizó la fórmula para la estimación de las medias utilizando una confiabilidad de 0.90 aplicada a una muestra piloto, teniendo como resultado un tamaño de muestra mínimo de 692 sueros (Daniel, 2002).

4.8 Muestras de campo

Se procesaron 827 sueros de caprino de diferentes edades, de las razas: Toggenburh (TG), Saanen (SN), Alpina Francesa (AF), Murciana Granadina (MG), Boer (BR), La mancha (MN) y Criolla (CR), cuya función zootécnica es la producción láctea. En la Tabla 4.1 se muestra la zona geográfica de las muestras analizadas, así como el número de sueros de cada Estado.

En algunos de los rebaños fue posible muestrear a toda la población, en otros sólo se muestreo de un 20 – 40 % de la población, debido a que los propietarios sólo permitieron que se manejaran y sangraran algunos animales. Cabe mencionar que tanto el muestreo de cada rebaño como el uso de los sueros remitidos, se llevó a cabo bajo la autorización del propietario o MVZ responsable de los animales.

Tabla 4.1 Procedencia de las muestras de campo.

Zona	Estado	Número de muestras
Centro	Distrito Federal	176 sueros
	Estado de México (Edo. Mex.)	221 sueros
	Guanajuato (Gto.)	107 sueros
	Morelos	103 sueros
Noroeste	Baja California Sur (B. C. S.)	17 sueros
Sureste (Región Mixteca)	Oaxaca y Guerrero	203 sueros
Total de muestras		827 sueros

4.8.1 Distrito Federal

Éste rebaño está ubicado en la Delegación Tlalpan, cuenta con una población de 176 animales en estabulación y ordeño mecánico una vez al día. Las muestras fueron remitidas por el MVZ responsable al Laboratorio de Serología del DMel-FMVZ-UNAM para diagnóstico serológico de *Brucella* spp. En la historia clínica

refieren un brote de problemas respiratorios un año antes del muestreo; por medio de histopatología se determinó como agente etiológico a *Mycoplasma* spp. Del total de la población al momento del muestreo, había 5 animales que enfermaron durante ese brote. Se procesó el 100 % de las muestras remitidas.

4.8.2 Estado de México

Se trabajaron muestras de rebaños pertenecientes a dos Municipios (Tabla 4.2), el rebaño del Municipio de Tepotzotlán cuenta con 130 animales en estabulación y ordeño mecánico una vez al día, de éste Municipio las muestras fueron remitidas por el MVZ responsable al Laboratorio de Serología del DMeI-FMVZ-UNAM para diagnóstico serológico de *Brucella* spp., se refieren problemas respiratorios causados por micoplasmas un año antes del muestreo, el diagnóstico se realizó por medio del aislamiento. Por lo que para éste trabajo se procesaron el 100 % de las muestras remitidas.

En el Municipio de Zumpango se muestrearon 8 rebaños de la comunidad de San Juan Tianguistongo, de cada uno se muestreo un promedio del 20 % de la población; éstos animales son ordeñados manualmente una vez al día, se tienen en pastoreo y encierro nocturno. Los propietarios refieren problemas respiratorios (en vías respiratorias altas) durante todo el año, no se ha hecho ningún tipo de diagnóstico para conocer la etiología, no hay antecedentes de mortalidad que pudieran asociarse a éstos problemas. También se tomaron muestras nasales colectadas con hisopo, y leche de un 10 % de la población de cada rebaño, las

cuales se remitieron al Laboratorio de Micoplasmas del DMeI-FMVZ-UNAM para el aislamiento del microorganismo.

Para el muestreo de los rebaños del municipio de Zumpango se contó con el apoyo del Comité Estatal de Fomento y Protección Pecuaria del Estado de México, S. C.

Tabla 4.2 Muestras del Estado de México.

Municipio	Identificación del Rebaño	Antecedentes de problemas respiratorios	Número de muestras
Tepetzotlán	Edo. Mex.- Tepetzotlán	Un año antes del muestreo	130 sueros
Zumpango	Edo. Mex.- Zumpango	En vías respiratorias altas	91 sueros
Total de muestras			221 sueros

Se muestrearon 2 Municipios con un total de 9 rebaños y 221 muestras.

4.8.3 Guanajuato

Del Municipio de Apaseo “El Grande” se muestrearon dos rebaños, de cada uno de ellos se tomó suero del 40 % de la población total. Los animales son mantenidos en estabulación con ordeño mecánico 2 veces por día; así mismo se tomaron muestras nasales colectadas con hisopos, y leche de aproximadamente el 15 % de la población, dichas muestras fueron remitidas al Laboratorio de Micoplasmas del DMeI-FMVZ-UNAM para el aislamiento del microorganismo.

Del rebaño 1 hace dos años, 2 animales presentaron neumonía y mastitis, una de esas cabras murió y de la otra remitieron suero y leche para la determinación de

Ac's y aislamiento de *Mycoplasma* spp., respectivamente. En ese momento el propietario no permitió el muestreo de los demás animales.

Dos años después, el propietario permite el muestreo de los animales y el MVZ refiere problemas respiratorios ligeros en vías respiratorias altas.

En el rebaño 2, el MVZ refiere problemas respiratorios en algunos de los animales y sospecha de micoplasmas como agente causal, durante el muestreo se observan dos cabras con neumonía severa y otras con problemas respiratorios menores.

Para el muestreo de éstos rebaños se contó con el apoyo de la Asociación de Caprinocultores del Estado de Guanajuato.

Tabla 4.3 Muestras del Estado de Guanajuato.

Identificación del Rebaño	Antecedentes	Número de muestras
Gto-1	Muestra tomada 2 años antes	1 suero
Gto-1-bis	Sin problemas en los últimos meses	33 sueros
Gto-2	Animales con neumonías	73 sueros
Total de muestras		107 sueros

El rebaño Gto-1-bis, corresponde al muestreo dos años posteriores al muestreo del rebaño Gto-1.

4.8.4 Morelos

Rebaño ubicado en el Municipio de Yautepec en el que los animales son mantenidos en estabulación, realizan ordeño mecánico dos veces por día, cuenta con una población de 150 animales, de los cuales se tomaron muestras de suero del 69 % de los animales. En la historia clínica refieren un brote de problemas

respiratorios un año antes del muestreo; por medio de histopatología determinaron como agente etiológico a *Mycoplasma* spp. Del total de la población, al momento del muestreo había 15 animales que enfermaron durante el brote.

4.8.5 Baja California Sur

Del estado de B. C. S. remiten 17 sueros de un rebaño en el cual no se habían presentado problemas respiratorios, sin embargo en los rebaños aledaños se presentaron neumonías en las cuales se sospechó como agente etiológico a *Mycoplasma* spp. De éste rebaño se desconoce el total de la población y el sistema de producción.

4.8.6 Región Mixteca (Guerrero y Oaxaca)

Se muestrearon 203 animales pertenecientes a 10 rebaños ubicados en la Región Mixteca que comprende los estados de Guerrero y Oaxaca. Los animales son mantenidos en sistema de producción semi-intensivo con ordeño mecánico una vez al día. En estos rebaños se han presentado problemas respiratorios, mastitis, queratoconjuntivitis y artritis, sin embargo no se ha confirmado que sean causados por *Mycoplasma* spp. De la población total de cada uno de los rebaños, se tomaron muestras de suero (20 – 40 %) así como de leche, exudados nasales colectados con hisopos y líquido articular (15 – 30 %), éstas últimas fueron remitidas al Laboratorio de Micoplasmas del DMel-FMVZ-UNAM para el aislamiento.

Para el muestreo de éstos rebaños se contó con el apoyo del Instituto para el Desarrollo de la Mixteca.

4.8.7 Clasificación de los rebaños

Los rebaños se clasificaron con base en su historia clínica (Tabla 4.4), tomando para ello los antecedentes o presencia de problemas respiratorios en que se sospechara de micoplasmas o se hubiera confirmado su diagnóstico.

Tabla. 4.4 Clasificación de los rebaños

Procedencia	Identificación del rebaño	Historia clínica
Distrito Federal	D. F.	Problemas respiratorios un año antes
Estado de México	Edo. Mex.- Zumpango	Problemas respiratorios todo el año
	Edo. Mex.- Tepetzotlán	Problemas respiratorios un año antes
Guanajuato	Gto-1	2 animales con neumonía y mastitis
	Gto-1-bis	Neumonías 2 años antes
	Gto-2	Neumonías al momento del muestreo
Morelos	Morelos	Problemas respiratorios un año antes
Sureste	Región Mixteca	Problemas respiratorios todo el año
Baja California Sur	B. C. S.	Sin problemas respiratorios

Para ésta clasificación se consideraron los antecedentes de problemas causados por micoplasmas, la presencia de animales enfermos sospechosos a micoplasmas y la ausencia de micoplasmosis en los rebaños.

4.9 Procesamiento de las muestras de campo

4.9.1 Prueba de fijación de complemento

Se utilizó una modificación de lo descrito por Cunningham (1971), realizando la técnica del 100 % de hemólisis, la cual utiliza 2 unidades de complemento y 2 unidades de hemolisina, como diluyente se usó solución salina amortiguadora de trietanolamina. La prueba consta de dos fases: la fase invisible y la fase visible, las cuales se describen en los numerales 4.8.1.3 y 4.8.1.4, respectivamente.

Las diluciones de trabajo de las muestras de campo fueron determinadas con base en los títulos obtenidos en trabajos anteriores (Paling *et al.*, 1978; Muthomi *et al.*, 1983).

4.9.1.1 Tratamiento anticomplementario

En ocasiones los sueros presentan lo que se conoce como efecto antic', en el cual algunas proteínas y/o contaminación no permiten que se fije el complemento, evitando así poder realizar la lectura de la prueba. Para eliminar el efecto antic' los sueros fueron sometidos al tratamiento descrito por Díaz *et al.* (2001).

4.9.1.2 Controles de la prueba

La prueba se realizó en microplacas de fondo en "U", en cada una se trabajaron 6 M-C, S-C (+) y S-C (-) con sus respectivos controles antic', así como los controles de la prueba (Ag, Ag-C', C' y SH) (Figura 1).

4.9.1.3 Metodología de la fase invisible

En un volumen final de 25 μ l, se realizaron diluciones dobles seriadas desde 1/2 hasta 1/256 tanto de las M-C, como de los S-C (+) y S-C (-), las diluciones de los controles antic' fueron 1/2 y 1/4 para cada uno (Figura 1). Se agregaron 25 μ l de Ag en la concentración determinada a las diluciones de los sueros, y a los controles Ag y Ag-C'; a los controles antic' se les puso 25 μ l de SSAT como volumen compensatorio. A las diluciones de suero, controles antic' y controles Ag-C' y C' se les agregaron 25 μ l de C' conteniendo 2 UC'. La placa se incubó en baño maría a 37 °C por 60 minutos. Durante este tiempo se preparó el sistema hemolítico y se incubó en las mismas condiciones por un mínimo de 30 minutos.









4.9.1.4 Metodología de la fase visible

A los 60 minutos de incubación, se agregaron 50 μ l de SH a todos los pozos incluyendo controles y se incubó nuevamente por un periodo máximo de 30 minutos. Para la obtención de los títulos de los sueros, la prueba se revisó cada minuto a partir de los primeros 5 minutos de incubación hasta el momento de realizar la lectura final.

4.9.1.5 Interpretación de los controles de la prueba

La lectura final se realizó cuando en los controles antic', Ag, Ag-C', C' y SH se observó la reacción esperada para cada caso, como se muestra en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5 Interpretación de los controles de la prueba de FC'




Control	Resultado	
Antic' suero (+)	Hemólisis	
Antic' suero (-)	Hemólisis	
Ag	Sedimentación	 
Ag-C'	Hemólisis	
C'	Hemólisis	
SH	Sedimentación	 

Antes de sedimentarse el SH se observa una turbidez en el pozo.

4.9.1.6 Interpretación de la prueba

Para cada una de las M-C se determinó su título, el cual es la última dilución en la cual se observó reacción positiva; en el caso de presentar reacción negativa en todos los pozos, la M-C se consideró (-). En la Tabla 4.6, se ilustra como se observa una reacción positiva y una reacción negativa.

Tabla 4.6. Reacciones de la prueba de FC'

Reacción	Resultado	
Positiva	Sedimentación	 
Negativa	Hemólisis	

En una reacción (+) el C' se unió a la R-Ag-Ac durante la fase invisible, por lo que al agregar el SH no hubo C' que se uniera a éste. En la reacción (-) durante la fase invisible el C' quedó libre y se unió al SH provocando lisis de los GR.

4.9.2 Prueba de aglutinación indirecta

4.9.2.1 Adsorción de los sueros

Antes de ser sometidos a la prueba, tanto las M-C como los S-C (+) y S-C (-), fueron adsorbidos con GR de ovino siguiendo la metodología descrita en el Apéndice 8 (Cho *et al.*, 1975).

4.9.2.2 Controles de la prueba

Por cada serie de placas, se incluyeron los controles correspondientes a cada M-C, S-C (+) y S-C (-), glóbulos rojos tanados (GRT) y glóbulos rojos sensibilizados (GRS), estos últimos por duplicado (Figura 2) (Cunningham, 1971).

4.9.2.3 Metodología de la prueba






Para la realización de la prueba se utilizaron microplacas de fondo en “U”, en cada una se trabajaron 6 M-C y por cada serie de microplacas trabajadas se utilizaron los controles de S-C (+) y S-C (-). Para determinar el título, a cada suero se le realizaron diluciones dobles seriadas iniciando 1/2 hasta 1/1024, en un volumen final de 25 μ l y paralelamente, se realizaron diluciones de 1/2 a 1/64 de cada uno, mismas que se utilizaron como control del suero (Figura 2). Se agregaron 25 μ l de GRS al 1 % a las diluciones de las M-C y al control de GRS, a los controles de suero se les puso 25 μ l de GRT al 1 % así como a su respectivo control de GRT.

La placa homogeneizó con vortex¹ y se incubó a temperatura ambiente durante 30 a 180 minutos hasta el momento de realizar la lectura (Lam *et al.*, 1974; Cho *et al.*, 1975; Cunningham, 1971).

4.9.2.4 Interpretación de los controles de la prueba

La lectura final se realizó cuando en los controles GRS, GRT y control del suero se observó la reacción esperada para cada caso, como se muestra en la Tabla 4.7.

Tabla 4.7 Interpretación de los controles de la prueba de AI

Control	Resultado	
Control se suero de las M-C	Sedimentación	
Control de suero (+)	Sedimentación	
Control de suero (-)	Sedimentación	
Glóbulos rojos tanados	Sedimentación	
Glóbulos rojos sensibilizados	Sedimentación	



La sedimentación de los controles de suero nos indica que se eliminaron las aglutininas inespecíficas y en los controles de GRT y GRS que los eritrocitos no están presentando autoaglutinación.

4.9.2.5 Interpretación de la prueba

Para cada una de las M-C se determinó su título, el cual es la última dilución en la cual se observó reacción positiva; en el caso de observar reacción negativa en todos los pozos, la M-C se consideró (-). En la Tabla 4.8, se ilustra como se observa una reacción positiva y una reacción negativa.

¹ Vortex COLE-PARMER

Tabla 4.8 Reacciones de la prueba de AI

Control	Resultado	
Reacción positiva	Aglutinación	
Reacción negativa	Sedimentación	

La aglutinación es debida a la presencia de Ac's contra *Mycoplasma* spp. La sedimentación se presenta cuando no hay Ac's en el suero.

4.10 Determinación del punto de corte

El punto de corte es el criterio utilizado para determinar el título con el cual el animal se considera positivo y negativo, para ello se relacionaron los resultados obtenidos en los aislamientos de las muestras remitidas al Laboratorio de Micoplasmas con los títulos obtenidos en cada una de las pruebas.

4.11 Prueba de homogeneidad de Xi cuadrada

Para determinar si hay diferencia estadísticamente significativa entre ambas pruebas se corrió una prueba de homogeneidad de Xi cuadrada.

4.12 Determinación de la sensibilidad y especificidad de las pruebas

Se utilizó el Teorema de Bayes para la determinación de sensibilidad y especificidad, así como para estimar el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo de ambas pruebas (Daniel, 2002).

5.0 RESULTADOS

5.1 Antisueros contra *Mycoplasma* spp.

Durante los monitoreos para evaluar la seroconversión en los conejos, se decidió realizar el sangrado en blanco cuando se observaron líneas intensas de precipitación en las pruebas de IDD (Figura 3) y CIEF (Figura 4); en la Tabla 5.1 se muestran los días en que se realizaron tanto el monitoreo como el sangrado en blanco.

Tabla 5.1 Sangrado de los conejos durante la elaboración de antisueros

Protocolo de inmunización	Monitoreos	Sangrado en blanco
Tully <i>et al.</i> (1983)	Día 28	Día 35
	Día 35	
Morilla <i>et al.</i> (1986)	Cada 3 ^{er} día a	Día 25
	partir de la 5 ^a inoculación	

5.2 Reacción cruzada de *Mycoplasma* spp.

Al realizar las pruebas de IDD y CIEF, con los Ag's de *Mycoplasma bovis*, *A. laidlawii* y *U. diversum* con el antisuero elaborado; así como en las pruebas de FC' y AI, el Ag de *Mycoplasma* spp. del grupo *mycoides* con antisueros de *M. bovis* y *M. hyopneumoniae*, los resultados fueron negativos, lo que indica que no hay reacción cruzada del Ag y los antisueros con otros Mollicutes ajenos al grupo *mycoides*.

5.3 Determinación de las características del antígeno

Con los resultados obtenidos del lote piloto (ver numeral 4.4), se realizó la prueba de homogeneidad de Xi cuadrada, no observándose diferencia estadísticamente significativa al tener un valor de $P=0.1580$, por lo que se decidió utilizar el Ag completo para todos los sueros considerados en éste trabajo.

5.4 Titulación de los antisueros contra *Mycoplasma* spp.

Los títulos de los antisueros se determinaron tanto en la prueba de FC', como en la de AI, con las metodologías descritas en los numerales 4.8.1 y 4.8.2, respectivamente. Los títulos de los antisueros obtenidos en la prueba de FC' y AI, muestran que los animales inmunizados con el protocolo de Tully *et al.* (1983) presentaron una mejor seroconversión que los inmunizados con el protocolo de Morilla *et al.* (1986) (ver Tablas 5.4 y 5.5)

Tabla 5.4 Títulos de los antisueros con la prueba de FC' (Figura 5)

Protocolo de inmunización	Suero de conejo	Título obtenido
Tully <i>et al.</i> (1983)	Conejo 1	1/512
	Conejo 2	1/512
Morilla <i>et al.</i> (1986)	Conejo 1	1/32
	Conejo 2	1/32

Tabla 5.5 Títulos de los antisueros con la prueba de AI (Figura 6)

Protocolo de inmunización	Suero de conejo	Título obtenido
Tully <i>et al.</i> (1983)	Conejo 1	1/1028
	Conejo 2	1/1028
Morilla <i>et al.</i> (1986)	Conejo 1	1/256
	Conejo 2	1/256

5.5 Determinación del punto de corte

Los animales que resultaron positivos al aislamiento, en la prueba de FC' presentaron títulos desde 1/16, mientras que en la prueba de AI los títulos fueron desde 1/2, sin embargo, algunos de los animales de los cuales se aisló *Mycoplasma* spp. Resultaron negativos a la prueba de AI. Con estos datos se determinó el punto de corte como se muestra a continuación:

Fijación de complemento	Negativos → (-) o títulos iguales o menores a 1/8
	Positivos → Títulos iguales o mayores a 1/16
Aglutinación indirecta	Negativos → (-)
	Positivos → Títulos iguales o mayores a 1/2

5.6 Resultados de las muestras de campo

5.6.1 Fijación de complemento

Los títulos obtenidos en la prueba de FC' de cada uno de los rebaños, se muestran en la Tabla 5.9. Con base en el punto de corte, en la Tabla 5.10 y en la Gráfica 1, se muestra el número de animales positivos y negativos.

Como se puede ver en la Tabla 5.10 los rebaños B. C. S. (sin problemas respiratorios y negativo al aislamiento) y Edo. Mex.-Zumpango (negativo al aislamiento) tuvieron animales positivos en un 0 y 10.99 % respectivamente.

En el rebaño Edo. Mex.-Tepetzotlán que presentó problemas respiratorio por micoplasmas un año antes del muestreo, se obtuvo un 26.62 % de animales positivos.

En los rebaños Gto-1, D. F. y Morelos, con antecedentes de problemas respiratorios causados por micoplasmas hace dos y un año respectivamente, el porcentaje de animales positivos fue menor del 20 %.

En el caso de los rebaños en que había problemas por micoplasmas al momento del muestreo, el porcentaje de animales positivos fue del 60 – 100 %.

5.6.2 Aglutinación indirecta

De los rebaños de Edo. Mex.-Tepetzotlán, D.F. y Morelos el número de muestras trabajadas por AI es menor que en FC', debido a que el suero fue insuficiente para trabajarlas por ambas pruebas, sin embargo, el número total de sueros (781) es mayor que el determinado como mínimo en el tamaño de la muestra.

Los títulos obtenidos en la prueba de AI en cada uno de los rebaños, se muestran en la Tabla 5.11. Con base en el punto de corte, en la Tabla 5.12 y en la Gráfica 2, se muestra el número de animales positivos y negativos.

En los rebaños de B. C. S. (sin antecedentes y sin aislamientos) y en Edo. Mex.-Zumpango (sin aislamientos) el porcentaje de animales positivos a la prueba fue menor al 6 %.

De los rebaños con antecedentes de problemas respiratorios por micoplasmas 1 o 2 años antes del muestreo (Edo. Mex.-Tepotzotlán, D. F., Morelos y Gto-1-bis), se tuvieron animales positivos del 28 % al 66 %.

De los rebaños con aislamientos de micoplasmas, hubo animales positivos a la prueba desde el 38 % hasta el 100 %.

En la Gráfica 3, se muestra un comparativo de ambas pruebas.

5.7. Prueba de homogeneidad de Xi cuadrada

Se determinó diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.01$) entre las pruebas de FC' y AI.

Tabla 5.9 Títulos de las muestras en la prueba de FC'

Identificación del rebaño	Número de muestras por título									Total
	(-)	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	
B. C. S.	13	2	2	0	0	0	0	0	0	17
Edo. Mex.-Zumpango	18	26	26	11	9	1	0	0	0	91
Edo. Mex.-Tepotzotlán	57	21	2	18	24	6	1	1	0	130
Gto-1-bis	42	9	2	11	7	2	0	0	0	73
D. F.	142	19	6	3	2	4	0	0	0	176
Morelos	53	16	7	8	14	5	0	0	0	103
Gto-1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
Gto-2	0	0	0	0	15	14	2	0	2	33
Región Mixteca	2	10	16	34	90	37	13	1	0	203
Total	327	103	61	85	161	70	16	2	2	827

Los datos sombreados indican los títulos con los que se consideran positivos los animales

Tabla 5.10 Animales negativos y positivos en la prueba de FC'

Rebaño	Antecedentes de micoplasmas	(-)	% (-)	(+)	% (+)
B. C. S.	(-) ¹	17	100 %	0	0.00 %
Edo. Mex.- Zumpango	(-) ¹	81	89.01 %	10	10.99 %
Edo. Mex.- Tepotzotlán	1 año antes ¹	98	75.38 %	32	24.62 %
Gto-1-bis	2 años antes ¹	64	87.67 %	9	12.33 %
D. F.	1 año antes ²	170	96.59 %	6	3.41 %
Morelos	1 año antes ²	84	81.55 %	19	18.45 %
Gto-1	(+) ¹	0	0.00 %	1	100 %
Gto-2	(+) ¹	0	0.00 %	33	100 %
Región Mixteca	(+) ¹	62	30.54 %	141	69.46 %
TOTAL		576	69.65 %	251	30.35 %

¹ Diagnóstico realizado por aislamiento. ² Diagnóstico realizado por histopatología.

Gráfica 1 Animales positivos y negativos a la prueba de FC'

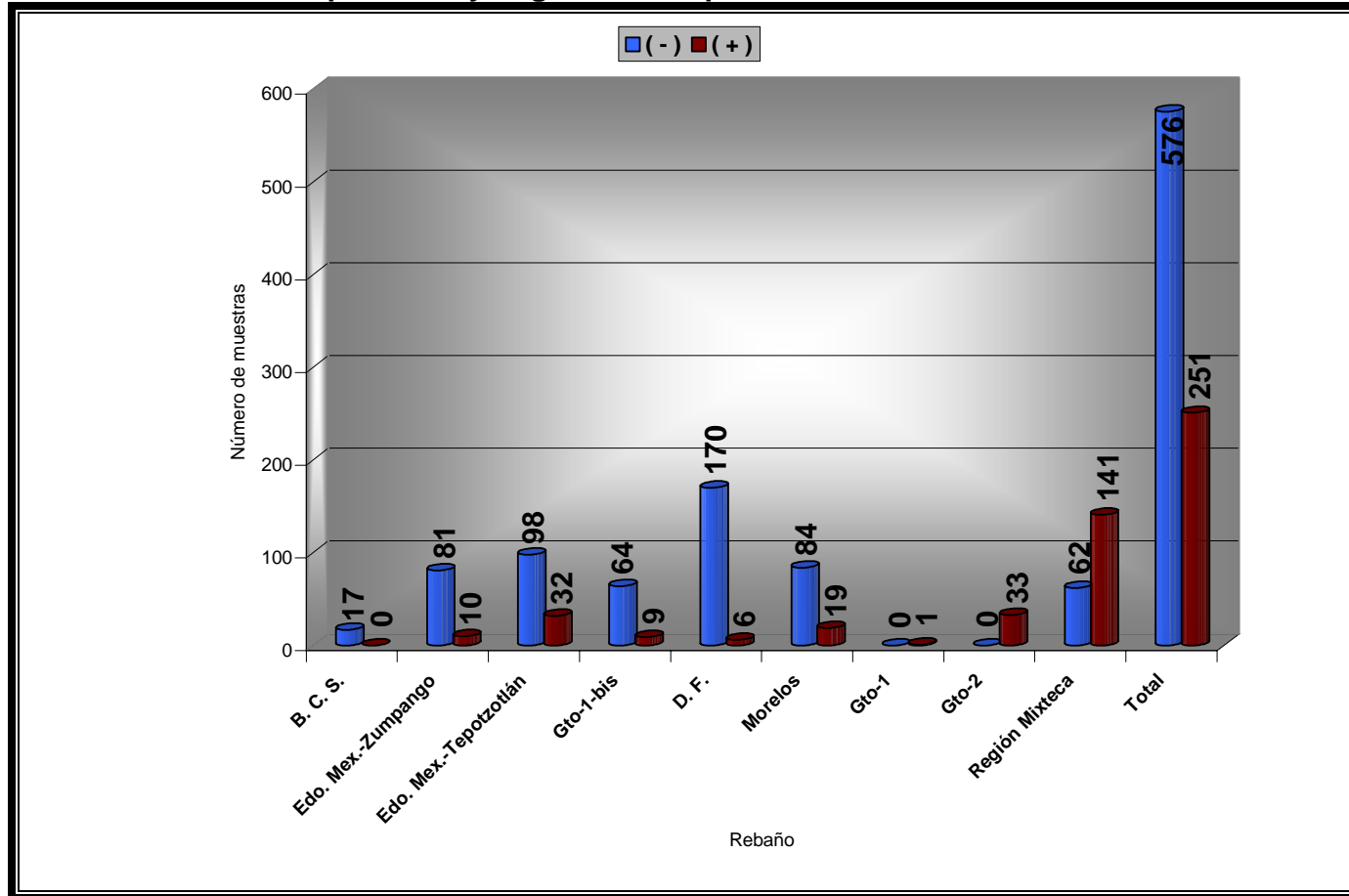


Tabla 5.11 Títulos de las muestras en la prueba de AI

Identificación del rebaño	Número de muestras por título									Total
	(-)	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	
B. C. S.	16	1	0	0	0	0	0	0	0	17
Edo. Mex.-Zumpango	87	1	1	1	1	0	0	0	0	91
Edo. Mex.-Tepotzotlán	47	54	16	6	1	1	0	0	0	125
Gto-1-bis	25	24	11	8	1	1	0	2	1	73
D. F.	97	4	13	6	12	4	1	1	1	139
Morelos	71	14	11	2	1	0	0	0	0	99
Gto-1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Gto-2	17	9	4	0	2	0	1	0	0	33
Región Mixteca	125	42	19	11	2	4	0	0	0	203
Total	485	150	75	34	20	10	2	3	2	781

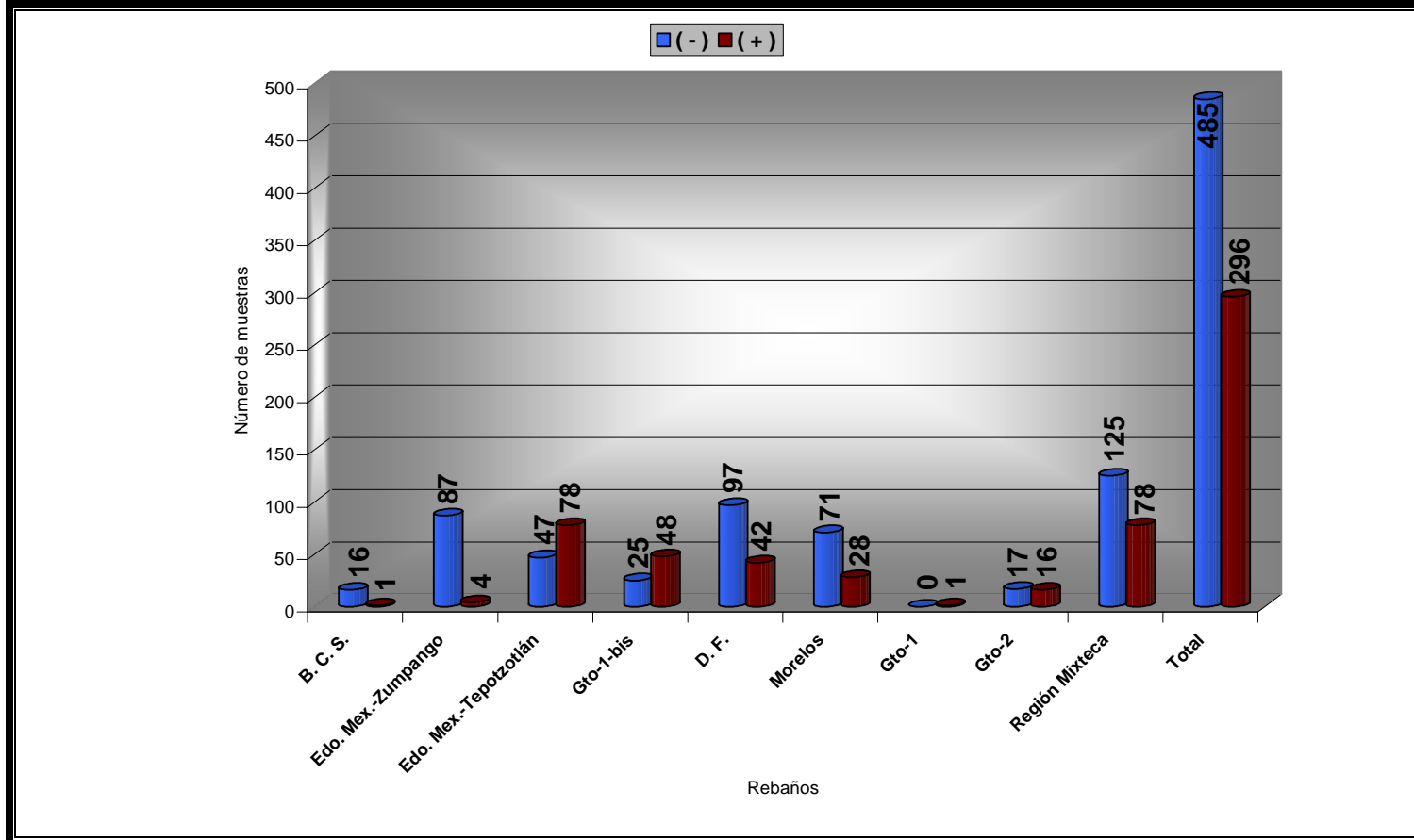
Los datos sombreados indican los títulos con los que se consideran positivos los animales

Tabla 5.12 Animales negativos y positivos en la prueba de AI

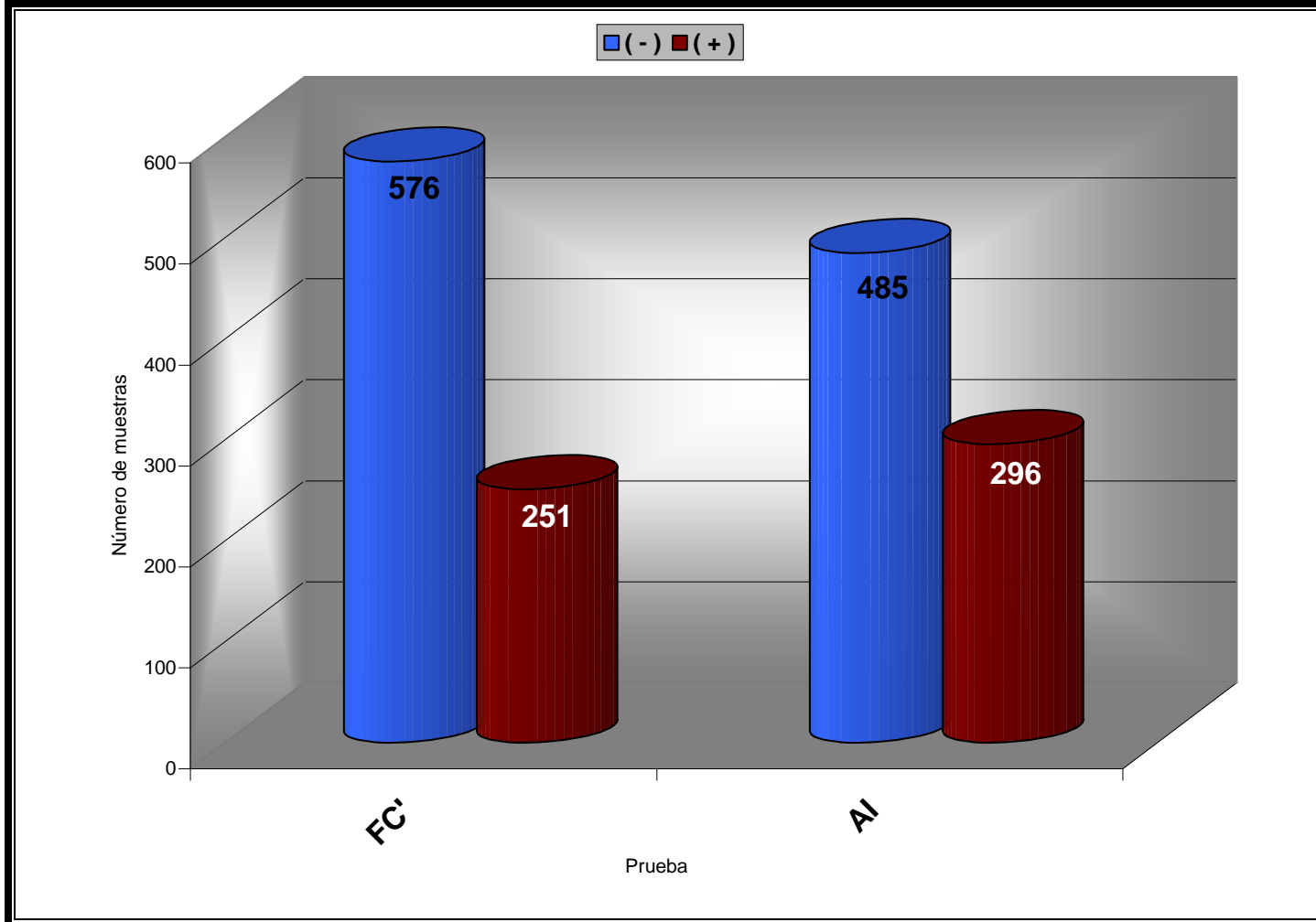
Rebaño	Antecedentes de micoplasmas	(-)	% (-)	(+)	% (+)
B. C. S.	(-) ¹	16	94.12 %	1	5.88 %
Edo. Mex.- Zumpango	(-) ¹	87	95.60 %	4	4.40 %
Edo. Mex.- Tepetzotlán	1 año antes ¹	47	37.60 %	78	62.40 %
Gto-1-bis	2 años antes ¹	25	34.25 %	48	65.75 %
D. F.	1 año antes ²	97	69.78 %	42	30.22 %
Morelos	1 año antes ²	71	71.72 %	28	28.28 %
Gto-1	(+) ¹	0	0.00 %	1	100 %
Gto-2	(+) ¹	17	51.52 %	16	48.48 %
Región Mixteca	(+) ¹	125	61.58 %	78	38.42 %
TOTAL		485	62.10 %	296	37.90 %

¹ Diagnóstico realizado por aislamiento. ² Diagnóstico realizado por histopatología.

Gráfica 2 Animales negativos y positivos a la prueba de AI



Gráfica 3 Comparativo de las pruebas de FC' y AI



Se encontró diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.01$) entre ambas pruebas

5.8 Determinación de la sensibilidad y especificidad de las pruebas

Al desarrollar el cuadro de contingencia para el Teorema de Bayes se obtuvieron los siguientes resultados:

Prueba de fijación de complemento

- Sensibilidad → 93.33 %
- Especificidad → 72.27 %
- Valor predictivo positivo → 90.08 %
- Valor predictivo negativo → 80.06 %

Prueba de aglutinación indirecta

- Sensibilidad → 57.69 %
- Especificidad → 62.91 %
- Valor predictivo positivo → 59.96 %
- Valor predictivo negativo → 60.71 %

6.0 DISCUSIÓN

6.1 Características del antígeno

Los tres tipos de Ag's utilizados (completo, soluble y sonicado) de *Mycoplasma* spp. del grupo *mycoides* en ambas pruebas, no presentaron diferencia estadísticamente significativa entre ellos, por lo que se decidió utilizar el Ag completo debido a que se facilitaba la interpretación de las pruebas, además de representar un mejor costo en la preparación del mismo. Holmgren (1973), Cho *et al.* (1975), Muthomi *et al.* (1983), Jones *et al.* (1988) y Jones (1990) utilizaron Ag sonicado para las mismas pruebas; Lam *et al.* (1974), utilizaron proteínas obtenidas con sulfato de amonio para AI. Actualmente no hay estudios serológicos en el que se utilicen células completas de micoplasmas como Ag para las pruebas de FC' y/o AI; asimismo, ninguno de los autores reporta alguna desventaja de utilizar Ag completo de micoplasma.

6.2 Punto de corte

Comparando los resultados de los aislamientos con los títulos obtenidos en FC' se determinó que títulos iguales o mayores a 1/16 se consideran positivos a micoplasmosis. En Kenia, en donde la micoplasmosis es endémica y la especie involucrada que causa pérdidas económicas considerables es *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*, Paling *et al.* (1978) y Muthomi *et al.* (1983) consideraron positivos a animales con títulos iguales o mayores a 1/32 en la

prueba de FC', sin embargo no mencionan el criterio que utilizaron para determinar dicho punto de corte.

Para la prueba de AI se determinó que títulos a partir de 1/2 se consideraron positivos a micoplasmas. Muthomi *et al.* (1983), igualmente en Kenia reportan que títulos iguales o mayores a 1/10 se consideran positivos a *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae*, mientras que Jones *et al.* (1988), en Oman, establecen que títulos iguales o mayores a 1/40 son positivos para la misma especie de micoplasma, en ningún caso indican el criterio utilizado para la determinación del punto de corte.

Es importante señalar que en Kenia y Oman se lleva a cabo la inmunización contra micoplasmas, mientras que en México no se realiza la inmunización contra micoplasmas que afectan a los caprinos, esto es relevante ya que éstas pruebas no diferencian entre Ac's vacunales de no vacunales, por lo que el criterio para considerar a un animal positivo debe ser mas estricto.

6.3 Resultados de las muestras de campo

6.3.1 Rebaños sin micoplasmosis

En éstos rebaños se tuvieron 10 animales positivos en la prueba de FC' con títulos de 1/16 – 1/32; en AI 5 fueron positivos con títulos iguales al punto de corte. Dado que en el rebaño Edo. Mex.-Zumpango se presentan problemas en vías respiratorias altas y no se tuvieron aislamientos de micoplasmas, sería importante conocer si los animales fueron movilizados de rebaños con micoplasmosis.

6.3.2 Rebaños con antecedentes de micoplasmosis

Se determinaron 66 animales positivos a la prueba de FC' (1/16 – 1/128), mientras que para AI 196 (1/2 – 1/256), lo que sugiere que los animales han tenido contacto con el Ag, March *et al.* (2000) indican que la prueba de FC' puede detectar Ac's hasta 4 meses y Cho *et al.* (1976) detectaron en AI Ac's por un periodo mayor a un año, aunque en ambos estudios se trabajó con sueros de animales infectados experimentalmente con *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae*.

En este estudio se detectaron títulos de Ac's en sueros de animales hasta dos años posteriores a la presentación del problema, lo que sugiere que algunos de los animales sean portadores del microorganismo.

6.3.3 Rebaños con micoplasmosis

Se obtuvo un 69.46 % (Región Mixteca) y un 100 % (Gto-1 y Gto-2) de animales positivos en la prueba de FC', lo que concuerda con la morbilidad que presenta la enfermedad (del 60 al 100%).

En la prueba de AI el 38.42 % (Región Mixteca), 48.48 % (Gto-2) y 100 % (Gto-1) fueron positivos a la prueba. Es importante mencionar que algunos de los animales positivos al aislamiento, resultaron negativos a la prueba, lo que confirma la baja sensibilidad (57.69 %) y especificidad (62.91 %) de la prueba, además de que también se obtuvo un valor predictivo negativo bajo (60.71 %).

En México no hay reportes de estudios seroepidemiológicos en los que se haya utilizado la prueba de FC' y/o AI, sin embargo Solana *et al.* (1966), realizaron un estudio epizootológico en el cual utilizaron la prueba de aglutinación directa en

placa utilizando Ag de *M. mycoides* subsp. *capri*, sin mencionar un punto de corte. Muestrearon 16 estados de la República Mexicana. En Oaxaca analizaron 34 muestras provenientes de dos comunidades cercanas a la Región Mixteca y encontraron un 90 % de sueros con títulos. Del estado de Guanajuato trabajaron 4 muestras del Municipio de Apaseo "El Grande", de las cuales el 50 % fueron positivas, sin embargo ellos no indican una relación entre el resultado de la prueba y el aislamiento del microorganismo o bien por la presencia de signos clínicos sugerentes a micoplasmosis, además de que el número de muestras analizadas es reducido. Solana *et al.* (1967), reportan aislamientos de *Mycoplasma* spp., en el Estado de Oaxaca a partir de brotes de neumonías en caprinos. Todo lo anterior sugiere que el problema ésta presente en estas regiones a partir de la década de los 60's, nuestros resultados actualmente nos indican que el problema de la micoplasmosis en los caprinos se sigue presentando en ésta zona.

6.4 Sensibilidad y especificidad de las pruebas

La prueba de FC' mostró mayor sensibilidad y especificidad que la prueba de AI, utilizando Ag completo de *Mycoplasma* spp. del grupo *mycoides*, estos resultados contrastan con los de Muthomi *et al.* (1983), Rurangirwa *et al.* (1987), Jones (1990), March *et al.* (2000) y Nicholas (2002b), quienes reportan una mayor sensibilidad para la prueba de AI, mientras que para FC' una mayor especificidad con Ag sonificado de *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae*, el contraste entre los resultados probablemente se deba a la diferencia entre las cepas utilizadas.

7.0 CONCLUSIONES

En México no se realiza la inmunización contra la micoplasmosis en la población caprina, por lo que al detectar animales positivos en las pruebas de FC' y AI indica que los animales han tenido contacto con *Mycoplasma* spp. del grupo *mycoides*.

En la población estudiada se encontró una seroprevalencia contra *Mycoplasma* spp. del grupo *mycoides* del 30.35 % con la prueba de FC' y del 37.90 % con la prueba de AI.

La prueba de AI con una sensibilidad del 57.69 % y una especificidad del 62.91 %, no se consideró una herramienta útil para el diagnóstico serológico de micoplasmosis en caprinos, además de requerir la preparación de los GR el día que se realiza la prueba.

La prueba de FC' resulta una herramienta rápida y confiable para el diagnóstico serológico de la micoplasmosis caprina causada por *Mycoplasma* spp. del grupo *mycoides*, detectó Ac's contra *Mycoplasma* spp. por un periodo de hasta 2 años post-exposición, con lo anterior se confirma la hipótesis de que la prueba de FC' es más específica que la prueba de AI.

8.0 REFERENCIAS

1. Alley RM, Ionas G, Clarke JK. Chronic non-progressive pneumonia of sheep in New Zealand a review of the role of *Mycoplasma ovipneumoniae*. New Zealand Veterinary Journal 1999; 47:155-16
2. Alton GG, Jones ML, Pites DE. Las técnicas de Laboratorios en la Brucelosis. 2ª ed. Suiza: FAO – OMS, 1976
3. Assunção P, De la Fe C, Ramírez AS, Andrada M, Poveda JB. Serological study of contagious agalactia in herds of goats in the Canary Islands. Veterinary Record 2004;154:684-687
4. Ayling RD, Bashiruddin SE, Nicholas RAJ. *Mycoplasma* species and related organisms isolated from ruminants in Britain between 1990 y 2000. Veterinary Record 2004;155:413-416.
5. Bergonier D, Berthelot X, Poumarat F. contagious agalactia of small ruminants: current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. Rev Sci Tech Off Int Epiz 1997;16:848-873
6. Biberstein EL, Zee YC. Tratado de microbiología veterinaria. 1990.
7. Bradbury JM. Poultry mycoplasmas: sophisticated pathogens in simple guise. British Poultry Science 2005;46:125-136
8. Bölske G, Mattsson JG, Bascuñana CR, Bergstrom K, Wesonga H, Johansson KE. Diagnosis of Contagious Caprine Pleuropneumonia by Detection and Identification of *Mycoplasma capricolum* subsp *capripneumoniae* by PCR and Restriction Enzyme Analysis. Journal of Clinical Microbiology 1996;34:785-791.

9. Brooks GF, Butel JS, Morse. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 17ª ed. USA: Manual Moderno, 2002
10. Cedillo R ML, Yañez SJA. Los micoplasmas y el SIDA. Elementos 2003;49:23-27
11. Cho HJ, Ruhnke HL, Langford EV. The Indirect Hemagglutination test for the Detection of Antibodies in Cattle Naturally Infected with Mycoplasmas. Can. J. comp. Med. 1975;40:20-29
12. Ciprian CJA. Aislamiento y caracterización de micoplasmas a partir de pulmones neumónicos de ovinos y caprinos en México (Tesis de maestría). Cuautitlán (Estado de México) México: ENEP-Cuautitlán-UNAM y el Instituto Nacional de Investigación Pecuaria (SARH), 1977
13. Cunningham CH. Virología práctica. 6ª ed. España: Acribia, 1971
14. DaMassa AJ, Brooks DL, Holmberg CA, Moe AI. Caprine mycoplasmosis: An outbreak of mastitis and arthritis requiring the destruction of 700 goats. Veterinary Record 1987;120:409-413
15. Daniel WW. Bioestadística base para el análisis de las ciencias de la salud. 4ª ed. México: limusa wiley, 2002
16. De Aluja AS. Un brote de pleuropneumonía en cabras causado por *Mycoplasma mycoides*. Med. Vet. Zoot 1964;111:77-87
17. Díaz E, Hernández L, Valero G, Arellano B, et. al. Diagnóstico de Brucelosis Animal. 1ª ed. México: SAGARPA, 2001
18. Edward DG, Freundt EA. The classification and nomenclature of organisms of the pleuropneumonia group. J Gen Microbiol. 1956;14:197-207

19. Food and Agriculture Organization. Inventarios ganaderos. FAO, 2005. (Bajado el día 08 de agosto de 2005). Disponible en:
<http://faostat.fao.org/faostat/collections?version=ext&hasbulk=0&language=ES>
20. Fox LK, Kirk JH, Britten A. Mycoplasma Mastitis: A Review of Transmission and Control. J. Vet. Med. B;52:153-160
21. Giacometti M, Nicolet J, Frey J, Krawinkler M, Meier W, Welle M, Johansson KE, Degiorgis MP. Susceptibility of alpine ibex to conjunctivitis caused by inoculation of a sheep-strain of *Mycoplasma conjunctivae*. Veterinary Microbiology 1998;61:279-288
22. Hernández L, López J, St-Jacques M, Ontiveros L, Acosta J, Andel K. *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* associated with goat respiratory disease and high flock mortality. Can Vet J 2006;47:366-369
23. Hernández AL, López J, Ontiveros CL, Jiménez GN. Brote de neumonía en caprinos por *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* tipo LC (MmmLC). Memorias XXVIII Congreso Nacional de Buiatría; 2004,12-14 de agosto; Morelia (Michoacán) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC, 2004:121
24. Hill WKW. Standardization of the Complement Fixation Test for Brucellosis. Bull. Off. Int. Épiz. 1963;60:401-417
25. Holmgren H. An indirect haemagglutination test for detection of antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae* using formalinized tanned swine erythrocytes. Acta Vet Scand 1973;14:353-355
26. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9^a ed. USA: Williams & Wilkins, 1994

27. Jaramillo ML, Cruz ST, Pijoan AC, Ciprian CA. Caracterización de micoplasmas aislados de cabras en México. Memorias Reunión Anual de Investigación Pecuaria en México; 1983; México D. F.: SARH-UNAM, 1983:414-417
28. Jasper DE. Bovine mycoplasmal mastitis. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine* 1981;25:121-159
29. Jones GE, Wood AR. Microbiological and serological studies on caprine pneumonias in Oman. *Research in Veterinary Science* 1988;44:125-131
30. Jones GE. Pleuroneumonía contagiosa caprina. Serie técnica N° 9. París (Francia): Oficina Internacional de Epizootias, 1990
31. Lam GT, Morton HE. Stable Mycoplasma Antigen Preparations for Indirect Hemagglutination Test. *Applied Microbiology* 1974;27:356-359
32. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN), actualizado el 14 de Septiembre de 2005 (bajado el 01 de Noviembre de 2005). Disponible en <http://www.bacterio.cict.fr/mr.html>
33. March JB, Gammack C, Nicholas R. Rapid Detection of Contagious Caprine Pleuropneumonia Using a *Mycoplasma capricolum* subsp *capripneumoniae* Capsular Polysaccharide-Specific Antigen Detection Latex Agglutination Test. *Journal of Clinical Microbiology* 2000;38:4152-4159
34. March JB, Harrison JC, Borich SM. Humoral immune responses following experimental infection of goats with *Mycoplasma capricolum* subsp *capripneumoniae*. *Veterinary Microbiology* 2002;84:29-45
35. Martrenchar A, Bouchel D, Zoyem N. Isolation and experimental studies of *Mycoplasma mycoides* subsp *mycoides* LC and *Mycoplasma ovipneumoniae* in goats in northern Cameroon. *Small Ruminant Research* 1995;16:179-184

36. Miranda SA. Efectos clínicos y patológicos producidos por la inoculación de una cepa de *Mycoplasma* en el tracto respiratorio de cabras (Tesis de licenciatura). D. F. (Ciudad de México) México: FMVZ-UNAM, 1989
37. Morilla GA, Bautista GC. Manual de Inmunología. 1ª ed. México: Diana, 1986
38. Muthomi EK, Rurangirwa FR. Passive haemagglutination and complement fixation as diagnostic tests for contagious caprine pleuropneumonia caused by the F-38 strain of mycoplasma. *Research in Veterinary Science* 1983;35:1-4
39. Niag M, Rosenbusch F, Lopez-Virella J, Kaeberle ML. Expression of functions by normal sheep alveolar macrophages and their alteration by interaction with *Mycoplasma ovipneumoniae*. *Veterinary Microbiology* 1997;58:31-43
40. Nicholas RAJ (a). Improvements in the diagnosis and control of diseases of small ruminants caused by mycoplasmas. *Small Ruminant Research* 2002;45:145-149
41. Nicholas RAJ (b). Contagious Caprine Pleuropneumonia. Department of bacterial Diseases, The Veterinary Laboratories Agency, Addlestone, Surrey, UK. 2002 (Bajado el día 30 de Enero de 2004). Disponible en: <http://www.ivis.org>
42. NOM-062-ZOO-1999 Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. (Publicada en el Diario Oficial de la Federación el día Miércoles 22 de Agosto de 2001)
43. Oficina Internacional de Epizootias (OIE). París, Francia (bajado el día 28 de abril de 2007). Disponible en: http://www.oie.int/esp/normes/mcode/E_00125.htm#170

44. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Manual de Técnicas de Diagnóstico Viroológico, Laboratorios de Investigación y Diagnóstico Veterinario. Chile (Santiago):FAO, 1984
45. Otero NJ, Jaramillo ML, Quintero MMT. Asociación de *Railletia caprae* y la presencia de micoplasmas en cabras. Memorias XXVIII Congreso Nacional de Buiatría; 2004,12-14 de agosto; Morelia (Michoacán) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC, 2004:314
46. Paling RW, Macowan KJ, Karstad L. The prevalence of antibody to contagious caprine pleuropneumonia (*Mycoplasma* strain F38) in some wild herbivores and camels in Kenya. *Journal of Wildlife Diseases* 1978;14:305-308
47. Peyraud A, Woubit S, Poveda JB, De la Fe C, Mercier P, Thiaucourt F. A specific PCR for the detection of *Mycoplasma putrefaciens*, one of the agents of the contagious agalactia syndrome of goats. *Molecular and Cellular Probes* 2003;17:289-294
48. Pitcher DG, Nicholas RAJ. *Mycoplasma* host specificity: Fact or fiction?. *The Veterinary Journal* 2005;170:300-306
49. Pugh DG. *Sheep and Goat Medicine*. 1^a ed. USA: Saunders Company, 2002
50. Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular Biology and Pathogenicity of *Mycoplasmas*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1998;62:1094-1156
51. Rivera-Tapia JA, Cedillo-Ramírez ML, Vega-Benítez M. *Micoplasmas* y su importancia médica. *Rev Biomed* 2001;12:262-271

52. Rodríguez JL, Poveda JB, Gutiérrez C, Acosta B, Fernández A. Poliartrosis in kids associated with *Mycoplasma putrefaciens*. Veterinary Record 1994;135:406-407
53. Rottem S. Interaction of Mycoplasmas With Host Cells. Physiol Rev 2003;83:417-432
54. Rurangirwa FR, McGuire TC. Contagious caprine pleuropneumonia: Diagnosis and control. Department of Veterinary Microbiology and Pathology Washington State University. (Bajado el día 14 de Enero de 2004). Disponible en: <http://www.fao.org/wairdocs/ilri/x5473b/x5473b11.htm>
55. Rurangirwa FR, McGuire TC, Kibor A, Chema S. A latex agglutination test for field diagnosis of contagious caprine pleuropneumonia. Veterinary Record 1987;121:191-193
56. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Acuerdo mediante el cuál se enlistan las enfermedades y plagas exóticas y enzoóticas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos. México (DF): SAGAR, 1999. Publicado en el Diario Oficial de la Federación el día 5 de marzo de 1999.
57. Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación. Producción pecuaria en México 2000-2005. México (DF):SAGARPA, 2005. (Bajado el día 24 de abril del 2006). Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/prod0001.htm>
58. Solana MP, Udave LM. Estudios epizootiológicos de la pleuroneumonía contagiosa de las cabras. Técnica Pecuaria 1966;16-24

59. Solana P, Rivera E. Infection of goats in Mexico by *Mycoplasma mycoides* var *capri*. Ann. NY Acad. Sci. 1967;143:357-363
60. Sumano LHS, Ocampo CL. Farmacología Veterinaria. 2^a ed. México, DF (México): McGraw-Hill interamericana, 1997
61. Taylor TK, Bashiruddin JB, Gould AR. Relationships between Members of the *Mycoplasma mycoides* Cluster as Shown by DNA Probes and Sequence Analysis. International Journal of Systematic Bacteriology 1992;42:593-601
62. Thiaucourt F, Lorenzon S, David A, Breard A. Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster as shown by sequencing of a putative membrana protein gene. Veterinary Microbiology 2000;72:251-268
63. Thirkill CE, Kenny GE. Serological Comparison of Five Arginini-Utilizing *Mycoplasma* Species by Two-Dimensional Immunoelectrophoresis. Infection and immunity 1974;10:624-632
64. Tizard IR. Inmunología Veterinaria. 5^a ed. México D.F. (México): McGraw-Hill Interamericana, 1998
65. Tully JG, Clyde, Senterfit. Mycoplasma Techniques course: Preparation of Mycoplasma antisera. Bordeaux: International Organization for Mycoplasmaology (IOM). 1983
66. Tully JG, Whilcomb RF. The Mycoplasmas II: human and animal Mycoplasmas. 1st ed. USA: Academic Press, Inc, 1979
67. Whitford HW, Rosenbusch RF, Laueran LH. Mycoplasmosis in Animals: Laboratory Diagnosis. 1a ed. Iowa (USA): Iowa State University Press, 1994
68. Wight D, Hirsh C, Zee YC. Veterinary Microbiology. 1st ed. USA: Blackwell Science, 1999

9.0 FIGURAS

Figura 1. Esquema de microplaca para la prueba de fijación de complemento.

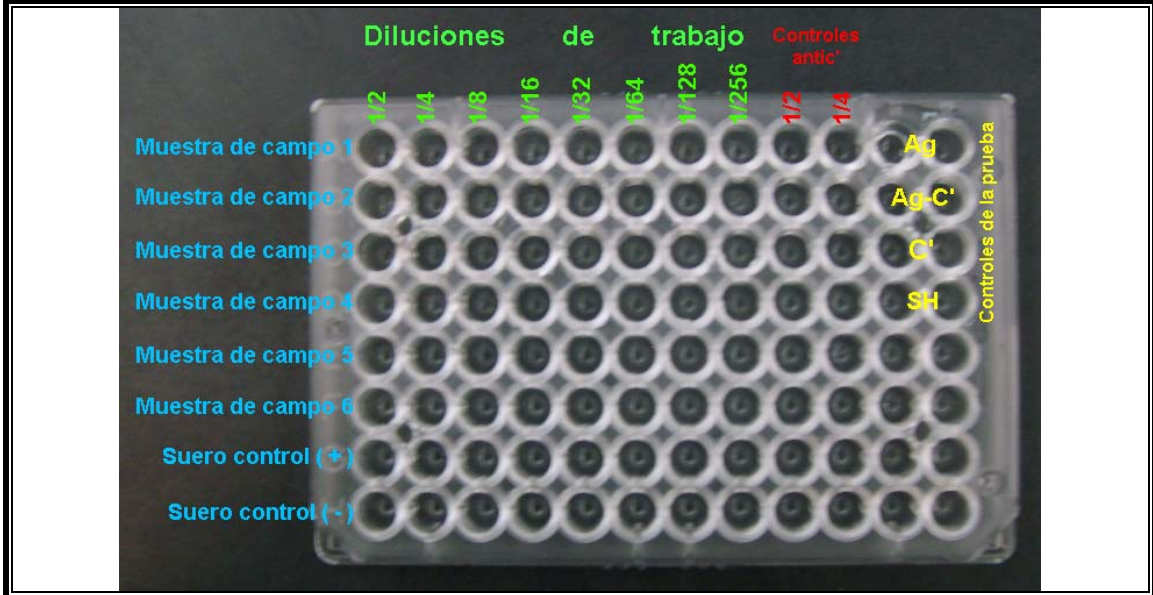


Figura 2. Esquema de microplaca para la prueba de aglutinación indirecta.

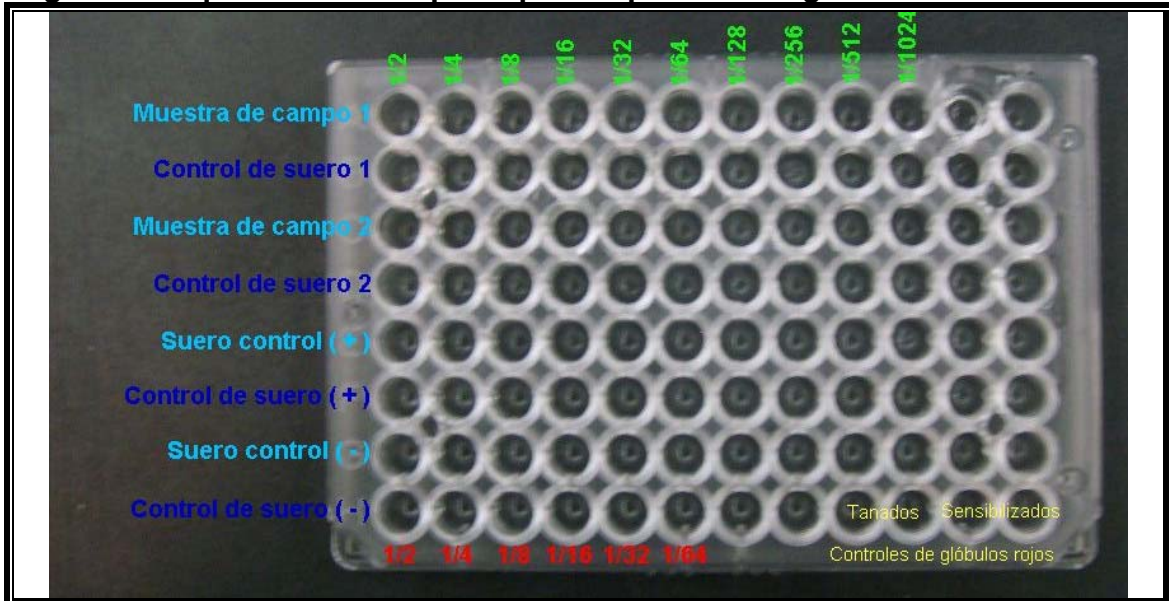


Figura 3. Esquema de la prueba de inmunodifusión doble.

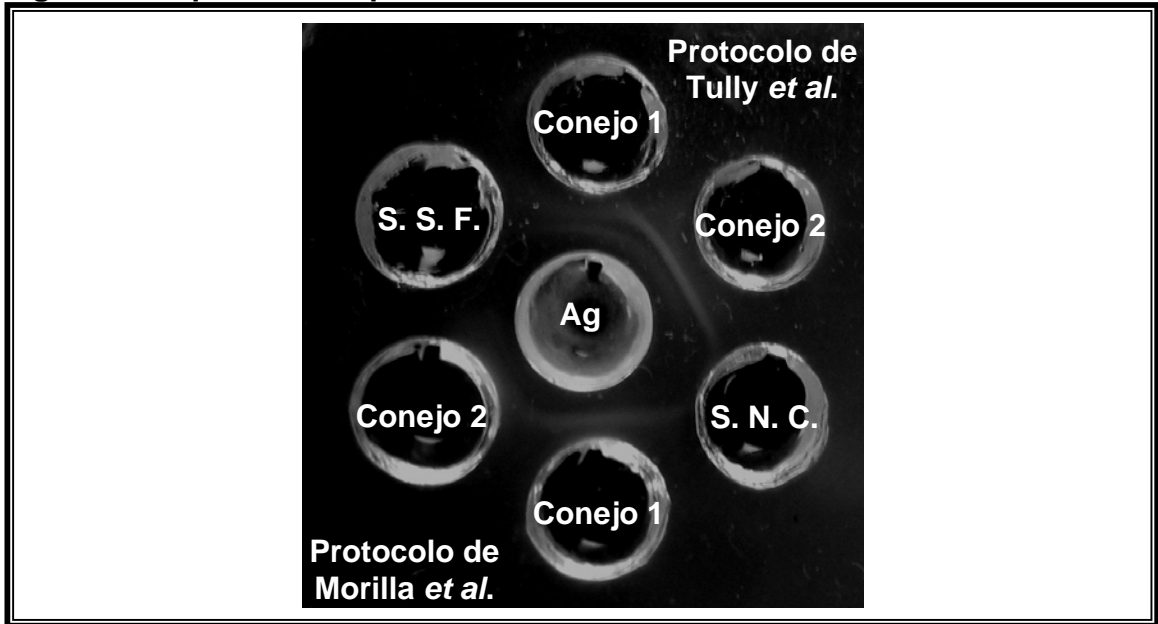


Figura 4. Esquema de la prueba de contrainmunolectroforesis.

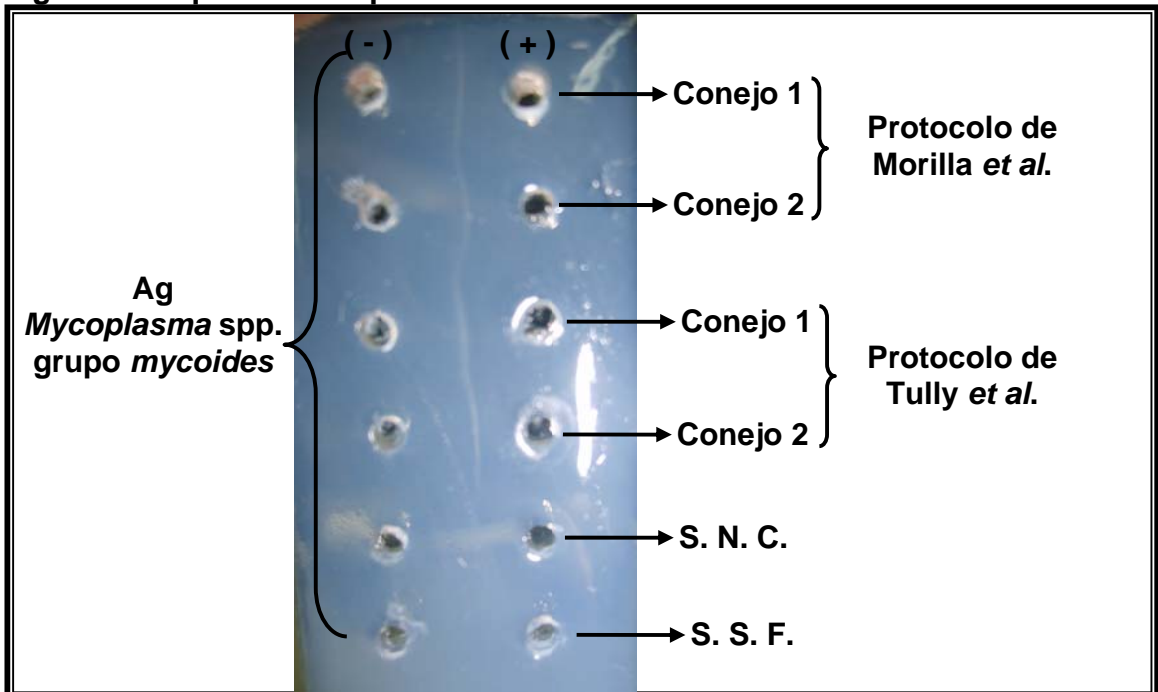


Figura 5. Titulación de antisueros por la prueba de fijación de complemento.

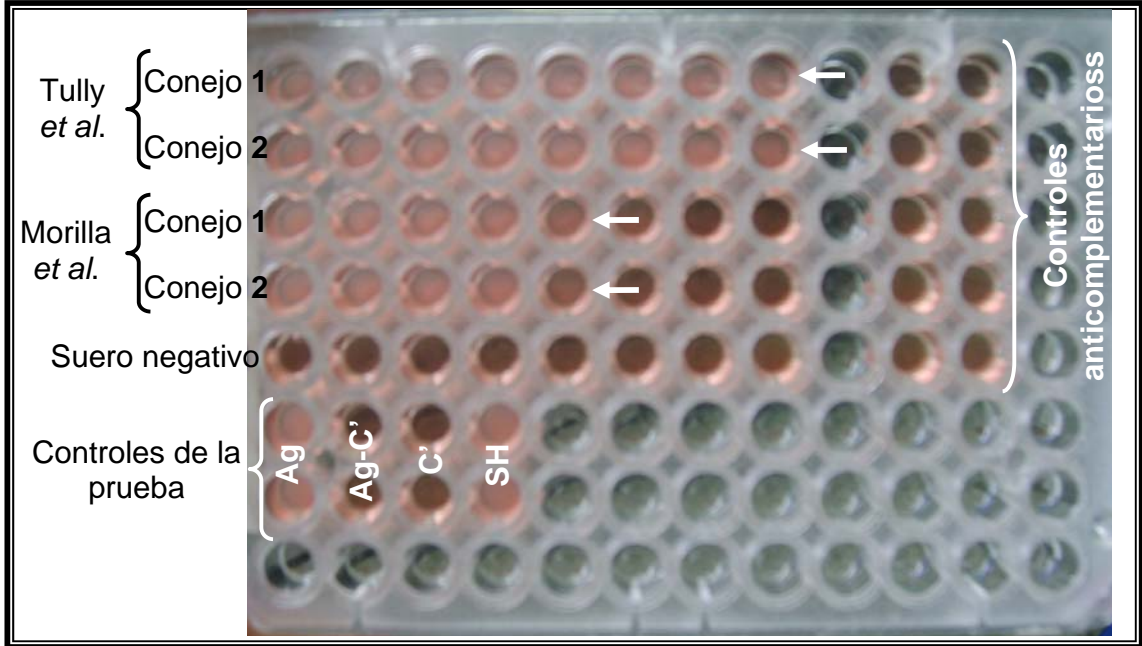
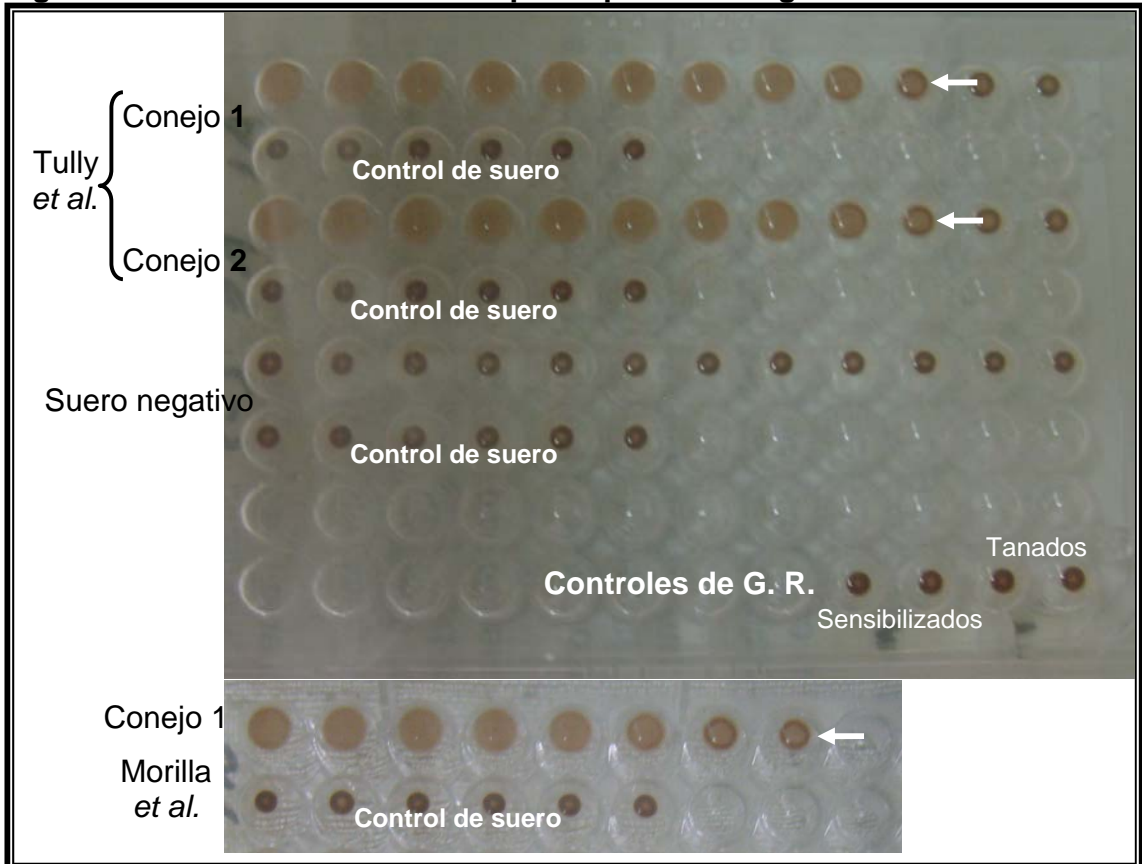


Figura 6. Titulación de antisueros por la prueba de aglutinación indirecta.

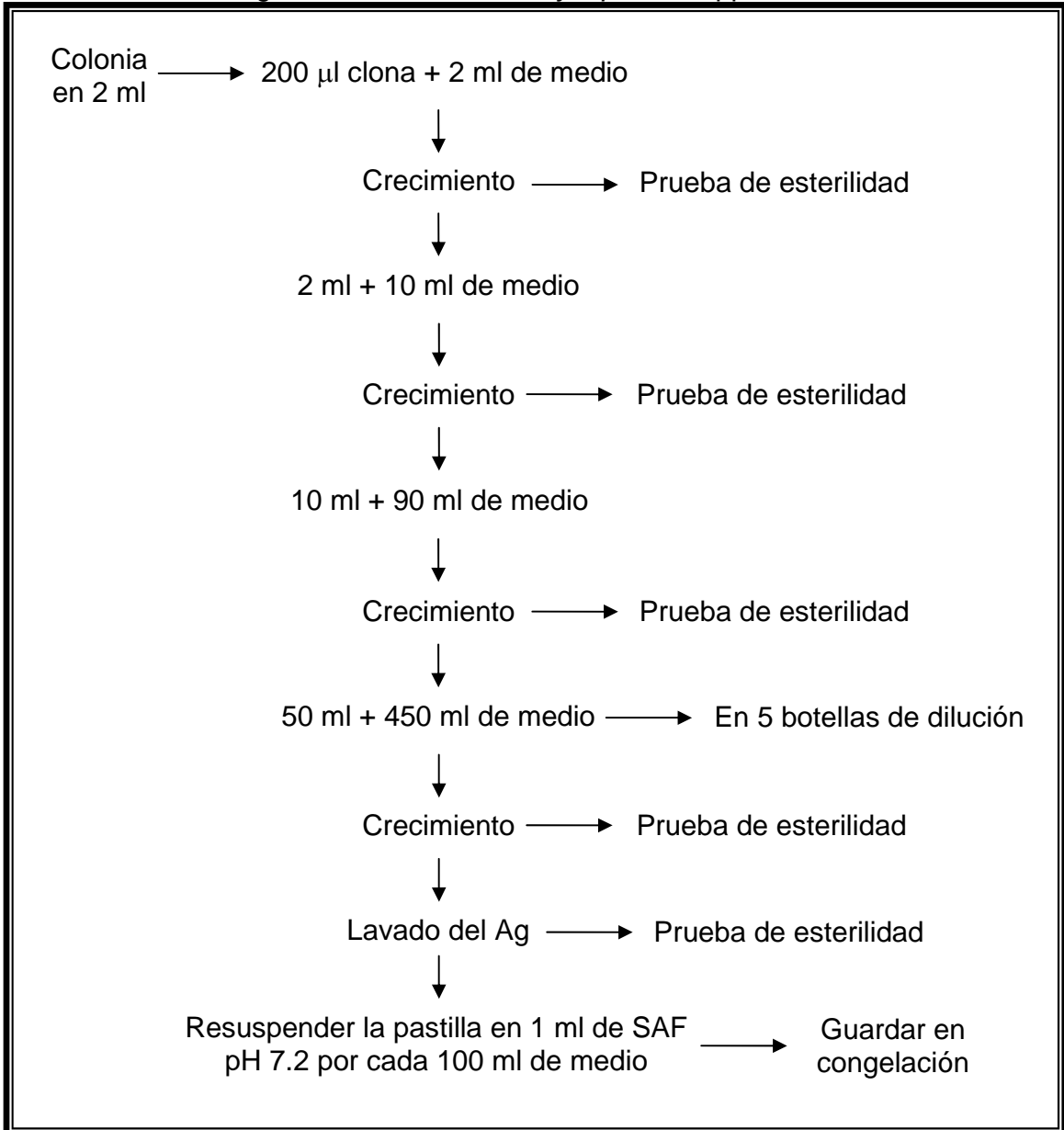


10.0 CUADROS

CUADRO 1

(Tully *et al.*, 1983)

Elaboración del antígeno concentrado de *Mycoplasma* spp.



Las incubaciones se realizan a 37 °C durante 24 horas en aerobiosis.

Para las pruebas de esterilidad se siembra en agar sangre y se incuba en las mismas condiciones.

CUADRO 2(Tully *et al*, 1983)Protocolo de inmunización para elaboración de antisuero contra *Mycoplasma* spp.

Día	Vía de inoc.	Vol. Inoc./ conejo	Observaciones
0	-	-	Sangrado basal
	Cojinete plantar	0.2 ml / cojinete	Inoc. en ambos cojinetes
	Intramuscular	0.5 ml / miembro	Inoc. en los 4 miembros
	Intradérmica	0.8 ml (0.1 ml / punto)	Inoc. en 8 puntos del dorso
21	Intramuscular	0.5 ml / miembro	Inoc. en los 4 miembros
28	-	-	Sangrado para monitoreo
35	-	-	Sangrado para monitoreo
42	-	-	Sangrado para monitoreo

Todas las inoculaciones se realizan con adyuvante completo de Freund¹ en proporción 1:1 y se mezcla en un homogeneizador² por 30 minutos.

Todo el manejo, inoculación y sangrado de los animales se realiza con base en la NOM-062-ZOO-1999

¹ Adyuvante completo de Freund SIGMA

² Homogeneizador VIRTIS

CUADRO 3

(FAO, 1984)

Protocolo de inmunización para la elaboración de hemolisina

Día	Inoculación	Volumen	Vía Inoc.	Observaciones
0	1 ^a	2.5 ml	IM	-
3	2 ^a	3.0 ml	IM	-
6	3 ^a	3.5 ml	IM	Sangrado para monitoreo
9	4 ^a	4.0 ml	IM	Sangrado para monitoreo
12	5 ^a	5.0 ml	IM	Sangrado para monitoreo
15	6 ^a	5.5 ml	IM	Sangrado para monitoreo
18	7 ^a	6.0 ml	IM	Sangrado para monitoreo
21	-	-	-	Sangrado para monitoreo

Las inmunizaciones se realizaron sin adyuvante.

Todo el manejo, inoculación y sangrado de los animales se realizó con base en la NOM-062-ZOO-1999.

11.0 APÉNDICES

APÉNDICE 1

Medio de cultivo líquido Hayflick¹

Caldo PPLO² 1.89 g

Agua destilada 90.00 ml

■ Esterilizar en autoclave³ a 121 °C/15 lb/15 minutos.

■ Al enfriarse adicionar los siguientes componentes del medio.

Rojo de fenol^a al 1 % 0.25 ml

Glucosa^b al 10 % 1.00 ml

Suero de equino^b 20.00 ml

Extracto de levadura^c al 10 % 10.00 ml

Penicilina G sódica 100 000 UI/ml

^a Esterilizar por autoclave a 121 °C/15 lb/15 minutos.

^b Esterilizar por filtración con membranas⁴ de 0.22 µm.

^c Esterilizar por autoclave a 121 °C/10 lb/10 minutos.

■ Después de preparar el medio de cultivo se realiza la prueba de esterilidad, sembrando en agar sangre e incubando a 37 °C durante 24 hrs y 2 ml de medio de cultivo se incuban a 37 °C por 24 – 48 horas.

¹ Medio Hayflick de Edward modificado, excluyendo el acetato de talio

² PPLO broth DIFCO

³ Autoclave AESA

⁴ Membranas MILLIPORE

APÉNDICE 1 BIS

Medio de cultivo sólido Hayflick

Preparar 60 ml de medio líquido Hayflick, como se indica en el APÉNDICE 1.

Agar noble al 0.8 %

Agar noble 0.56 g

Agua destilada 10.00 ml

- Esterilizar el agar en autoclave a 121 °C/15 lb/15 minutos.
- Dejar enfriar un poco el agar y mezclarlo con medio líquido ligeramente calentado y mezclarlos perfectamente.
- Colocar 7 ml de la mezcla en cada placa de petri sin hacer espuma y dejar solidificar.
- Una placa se incuba en microaerobiosis a 37 °C durante 24 hrs, el resto se refrigera hasta su uso.

APÉNDICE 2

Solución amortiguadora de fosfatos (SAF)

Cloruro de Sodio NaCl 8.50 g

Fosfato de sodio dibásico anhidro Na₂HPO₄ 1.10 g

Fosfato de sodio monobásico NaH₂PO₄ 0.32 g

Agua destilada c.b.p. H₂O 1000.00 ml

- Ajustar el pH deseado con ácido clorhídrico (HCl) reactivo analítico y/o con hidróxido de sodio (NaOH) 7N.

- Para aglutinación indirecta agregar 1 % de suero normal de conejo inactivado y adsorbido (APÉNDICE 8).

APÉNDICE 3

Obtención de suero (antisuero o suero normal)

- Sangrar a los animales por vía intracardiaca con aguja 14, 16 o 20 G (según la especie a sangrar).
- Colocar la sangre en placas de petri estériles.
- Dejar a temperatura ambiente hasta que se forme el coágulo.
- Cortar el coágulo en trozos pequeños (no cortar en exceso, ya que se puede hemolizar el suero).
- Centrifugar¹ en tubos con capacidad de 50 ml, estériles, a 3000 rpm a 4 °C por 5 minutos.
- Obtener el sobrenadante almacenándolo en las cantidades requeridas.

APÉNDICE 4

Sonicación del Ag de *Mycoplasma* spp.

- Realizar una dilución 1/25 del Ag de *Mycoplasma* spp. concentrado, en agua destilada estéril.
- Colocar la suspensión en un tubo de ensaye de plástico, el cual debe mantenerse en baño de hielo durante el proceso de sonicación.

¹ Centrifuga refrigerada BECKMAN

- Sonicar durante 2 minutos con ciclos de 9 segundos de intensidad a la máxima potencia, con 18 segundos de descanso.

APÉNDICE 5

Solución salina amortiguadora con trietanolamina (SSAT)

Solución 5x

Cloruro de sodio	NaCl	37.5 ml
Ácido clorhídrico 1 N	HCl	88.5 ml
Trietanolamina		14.0 ml
Solución 4.16 M de cloruro de magnesio	MgCl ₂	0.6 ml
Solución 1.25 M de cloruro de calcio	CaCl ₂	0.6 ml
Agua destilada c.b.p.	H ₂ O	1000.0 ml

- Disolver el NaCl en 600 ml de agua destilada en un matraz aforado de 1000 ml.
- Agregar el HCl y agitar.
- Agregar la trietanolamina, cuidando que no quede parte en el recipiente en el que se mide, enjuagando con agua destilada que se incorpora al matraz aforado.
- Agregar la solución de MgCl₂ y de CaCl₂.
- Aforar a 1000 ml con agua destilada.
- La solución 5x se puede conservar en refrigeración por varios meses.

Solución 1x

- Diluir 1/5 la solución 5x con agua destilada.

- Ajustar el pH entre 7.3 – 7.4 con NaOH 7N o HCl reactivo analítico.

La solución 1x se puede conservar en refrigeración por una semana.

APÉNDICE 6

Anticoagulante Alsever

Dextrosa	$C_6H_{12}O_6$	20.50 g
Citrato de sodio	$Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$	8.00 g
Ácido cítrico	$C_6H_8O_7$	0.55 g
Cloruro de sodio	NaCl	4.20 g
Agua destilada		1000.00 ml

- Esterilizar en autoclave a 121 °C/10 lb/10 minutos.
- Guardar en refrigeración.
- La proporción de anticoagulante y sangre debe ser 1:1.

APÉNDICE 7

Lavado de glóbulos rojos

1. Tomar una cantidad de GR con Alsever.
2. Centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos.
3. Eliminar el sobrenadante.
4. Agregar solución amortiguadora de pH a utilizar (para FC' o AI), en un volumen igual al eliminado.
5. Homogenizar suavemente.
6. Repetir los pasos 2 al 5 tres veces más.

7. Al finalizar la última centrifugación eliminar el sobrenadante y obtener el paquete de GR.

APÉNDICE 8

Adsorción de suero

- Inactivar el suero a 56 °C durante 30 minutos.
- Por cada 0.9 ml de suero agregar 0.1 ml de paquete de glóbulos rojos de ovino previamente lavados con SAF pH 7.2.
- Incubar a 37 °C por 60 minutos en baño serológico.
- Centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos.
- Obtener el sobrenadante.
- El suero se puede fraccionar y almacenar en congelación a –20 °C hasta su uso, en cuyo caso se debe de reactivar a 56 °C por 15 minutos, antes de utilizarse.