



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

AISLAMIENTO, TIPIFICACIÓN BIOQUÍMICA Y
MOLECULAR DE CEPAS DE *Mycoplasma bovis*
AISLADAS DE LECHE DE BOVINO PROCEDENTE DE
TANQUE DE ALMACENAMIENTO.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA
PRESENTA

VERÓNICA ROJAS TREJO

ASERORES:

DRA. ROSA ELENA MIRANDA MORALES

DR. FRANCISCO JOSE TRIGO TAVERA



MÉXICO D. F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO**DEDICATORIA**

II

AGRADECIMIENTOS

III

CONTENIDO

V

ABREVIATURAS

IX

RESUMEN

1

1.0 INTRODUCCIÓN

3

1.1 Situación Nacional del ganado lechero en México

3

1.2 Mastitis

4

1.3 Pérdidas económicas a causa de mastitis

4

1.4 Mastitis por *Mycoplasma bovis*

5

1.5 Pérdidas económicas a causa de mastitis por *Mycoplasma bovis*

5

1.6 Leche de tanque

6

1.7 Antecedentes históricos

7

1.8 Clasificación taxonómica

11

1.9 Generalidades de *Mycoplasma* spp.

15

1.10 Características estructurales

15

1.10.1 Membrana

15

1.10.2 Proteínas de superficie de membrana

16

1.10.3 Lípidos de superficie de membrana

18

1.11 Requerimientos nutricionales

18

11.12 Actividad metabólica

19

	Página
1.13 Factores de virulencia	20
1.13.1 Toxicidad	22
1.13.2 Adherencia	22
1.14 Características moleculares	23
1.15 Transmisión de <i>Mycoplasma bovis</i>	25
1.16 Diagnóstico	25
1.17 Prevención y control para <i>Mycoplasma bovis</i>	27
1.18 Tratamientos utilizados para <i>Mycoplasma bovis</i>	28
JUSTIFICACIÓN	29
2.0 HIPÓTESIS	30
3.0 OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo general	30
3.2 Objetivos específicos	30
4 MATERIAL Y MÉTODOS	31
4.0 Zona de muestreo	31
4.1 Colección de muestras	31
4.2 Aislamiento de <i>Mycoplasma</i> spp	32
4.2.1 Medio de cultivo	32
4.2.2 Control del medio de cultivo	32
4.2.3 Procesamiento de las muestras	33
4.3 Identificación de género	34
4.3.1 Morfología de colonia	34

	Página
4.3.2 Filtrabilidad	34
4.4.3.3 Reversión de formas Lister	34
4.3.4 Requerimiento de esteroides	35
4.4. Identificación bioquímica de especies de micoplasmas	35
4.4.1 Fermentación de la glucosa	36
4.4.2 Fermentación de la manosa	37
4.4.3 Hidrólisis de la arginina	37
4.4.4 Hidrólisis de la caseína	38
4.4.5 Reducción del tetrazolio	38
4.4.6 Producción de películas y manchas	39
4.5 Obtención de concentrado de cepas de micoplasmas y <i>Mycoplasma bovis</i> cepa Donneta.	41
4.6 Lavado de antígeno	41
4.7.0 Identificación molecular de <i>Mycoplasma bovis</i> por la PCR	42
4.7.1 Extracción de ADN	42
4.7.2 Reactivos para las reacciones de PCR	44
4.7.3 Optimización de la Técnica de la PCR	46
4.7.4 Visualización del gel	48
4.8 Análisis estadísticos	50
5.0 RESULTADOS	51
5.1 Resultados globales en los hatos muestreados de leche de tanque de almacenamiento	51

	Página
5.2 Resultados globales de las muestras de leche de tanque	52
5.2.1 Identificación bioquímica de las especies de micoplasmas aisladas en las muestras de leche de tanque de almacenamiento	53
5.2.1.1 Identificación de género	53
5.2.1.2 Identificación bioquímica de especie	53
5.2.2 Especies de micoplasmas aisladas en muestreo 1 y 2 de leche de tanque de almacenamiento	56
5.2.3 Resultados de hatos positivos al aislamiento de <i>Mycoplasma bovis</i>	58
5.3 Resultados globales en los hatos muestreados de leche de tanque de almacenamiento por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	58
5.3.1 Resultados de hatos positivos a <i>Mycoplasma bovis</i> por PCR	61
5.4 Identificación bioquímica y molecular de <i>Mycoplasma bovis</i> en leche de tanque de almacenamiento	62
5.5 Análisis estadístico	62
6.0 DISCUSIÓN	63
7.0 CONCLUSIONES	68
8.0 REFERENCIAS	69
9.0 APÉNDICES	77

ABREVIATURAS

(-)	Negativo
(+)	Positivo
μc	Micrómetro
μg	Microgramo ('s)
μl	Microlitro ('s)
A	Adenina
ARN	Ácido Ribonucleico
ATP	Adenosin trifosfato
C	Citosina
c.b.p.	Cuanto baste para
MgCl_2	Cloruro de Magnesio
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> : Ácido desoxirribonucleico
DNTP	Di nucleótido-trifosfato
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> : Ensayo inmuno enzimático
FMVZ	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
G	Guanina
kb	Kilo base
LC	<i>Large colony</i> : colonia grande
LPSN	List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclatura
M	Molar (soluciones molares)

NAD	Dinucleotido de Nicotinamida y Adenina
NMC	National Mastitis Council
°C	Grados centígrados
OPP	Oligopéptido Permeasa
P	Proteínas
PBS	Solución Buffer Fosfatos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PG	Fosfatilglicerol
pH	Potencial de Hidrogeno
PPLO	Organismos Asociados a Pleuroneumonía
Ps	Proteínas Superficie
RCS	Recuento Celular Somático
SAGARPA	Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación
SC	<i>Small colony</i> Colonia pequeña
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
T	Timina
Taq	<i>Termus aquaticus</i>
TNF	Factor de necrosis tumoral
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
VSP	Proteínas Variables de Superficie
IOM	Organization of Mycoplasmology

Dedico este trabajo a:

-Mis padres: **Enrique y Eva** con todo mi corazón, por darme la vida, por ayudarme a cumplir todos mis sueños, por darme la oportunidad de concluir una carrera hermosa como lo es la medicina veterinaria, por todo el amor y cariño que me dieron. Muchas gracias los amo.

-A mis Hermanas: **Mireya y Karina** por ser mis mejores amigas, por soportarme, por apoyarme incondicionalmente y confiar siempre en mí, estoy muy orgullosa de tenerlas a mi lado como hermanas ya que son mi mayor apoyo.

-A mis sobrinos: **Alexis y Frida** por ser la luz en mí vida desde el momento que llegaron a este mundo, por ser mi inspiración y mi fuerza de cada día los amo muchísimo y siempre estaré a su lado, gracias por llenar mi vida de esperanza.

- A **Rolando**, Por tener siempre fe en mí, por ser mí apoyo incondicional, por estar siempre a mi lado en los momentos buenos y malos. Además, por haberme demostrado lo hermoso que es amar. Una vez más gracias. Te amo.

-A **Mayra y Toñito**, Con mucho cariño, son parte de mi vida.

Todo o que hago siempre es por ustedes mi familia, lo más importante para mí en este mundo.

Agradecimientos

A la Doctora Rosa Elena Miranda Morales, por guiarme y enseñarme tanto en este camino de la investigación, es una gran mujer que admiro, respeto y tengo gran cariño gracias la quiero mucho.

Al Doctor Francisco Trigo Tavera por apoyarme en este proyecto.

A los miembros de mi jurado, Dr. Miguel Ángel Blanco, Dr. Miguel Ángel Quiroz, Dr. Alfredo Sahagún, y en especial al Dr. Rigoberto Hernández por ser una persona excelente, su enseñanza y su apoyo eres parte fundamental en este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio de Micoplasmas fue lindo trabajar con ustedes, Martha Juárez, Alejandro Jiménez, José Luis Corona, Cnidia (eres parte de micoplasmas) Alejandra, Carlos, Erika y Sra. Georgina.

A Martita por que eres una persona muy especial me diste una mano siempre que la necesite. Gracias Mar.

Al todos los integrantes del departamento de Microbiología e Inmunología que siempre me ofrecieron una mano y una sonrisa, Lab. de Serología; Dra. Myrna, Grisel, Juan Carlos Cindy, Lab. de Practicas; Mary Toña, Julio, Fabiola R, Lab. Micología; Andira, Chucho, Ceci, Lab. Leptospira; Dr. Alejandro de la Peña, Oli, Carlos, Rodri, Preparación de medios; MVZ. Eli, MVZ. Fabiola, Raúl Segura y todos los compañeros de los laboratorios de Inmunología molecular, Virología, *Brucella* y Tuberculosis Dr. Francisco Suárez, Dr. Pabello, Lucy, Juliette, Rosalía. A Lupita y Rosy, etc. Somos una gran Familia.

A Víctor por su colaboración en este trabajo.

Al Doctor, Rafael Soto Castor, y al apoyo otorgado por la Asociación de ganaderos de la cuenca de Tizayuca. Hidalgo.

A todos mis amigos de la FMVZ, por cada palabra de aliento y esos momentos que compartimos durante 5 años maravillosos. Gracias: Adriana, Andira, Mony, Bren, Itzel, Sony, Miriam, Arlen, Ale, Mauricio, Alejandro, Oscar, Humberto, Adrián, Michelle, Felipe.

A mis amigos de la preparatoria Christian, Edgar, Israel, Adhair, Quetzalcoatl, Julio, Jeny, Mony, Bren, Laura, Liby, Liz, etc. Que los extraño mucho y son parte de mi vida los quiero.

Al proyecto PAPITT IN-215506-3 DGAPA-UNAM por el financiamiento de este proyecto.

RESUMEN

ROJAS TREJO VERÓNICA. Aislamiento, tipificación bioquímica y molecular de cepas de *Mycoplasma bovis* aisladas de leche de bovino procedente de tanque de almacenamiento. Bajo la dirección de: Dra. Rosa Elena Miranda Morales y Dr. Francisco J Trigo Tavera.

La mastitis en el ganado bovino es una de las principales causas en pérdidas económicas a nivel mundial, el control de los microorganismos asociados a este problema sigue siendo parte fundamental de estudios para realizar un diagnóstico eficaz y tener un control de la mastitis bovina. El muestreo en tanques de almacenamiento facilita el monitoreo a nivel de hato en cuanto a patógenos involucrados a la mastitis bovina y permitirá mejorar el perfil sanitario del hato. *Mycoplasma bovis* es un microorganismo asociado a mastitis aguda y crónica reincidente con alta diseminación, también se considera como patógeno involucrado a problemas respiratorios, infertilidad, artritis, abortos orquitis y conjuntivitis. Es importante mencionar *Mycoplasma spp*, *Staphylococcus aureus*, y *Streptococcus agalactiae* están considerados como microorganismos contagiosos y patógenos primarios causantes de mastitis bovina. Con el fin establecer la presencia de *Mycoplasma bovis* en leche de tanque de almacenamiento de hatos ubicados en el Estado de Hidalgo, se analizaron 224 muestras provenientes de 112 tanques, de los cuales se realizaron dos muestreos con un intervalo de 15 días. Cada muestra fue procesada para su aislamiento e identificación bioquímica y molecular por la técnica de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Para el aislamiento se utilizó el medio de Hayflick y los aislados fueron

identificados bioquímicamente siguiendo las recomendaciones del IOM (Organization of Mycoplasmology), la identificación molecular se realizó utilizando la secuencia que codifica al gen de la permeasa OppD y OppF de *Mycoplasma bovis*. Los resultados muestran que el 62 % de los hatos analizados fueron positivos al aislamiento de *Mollicutes*, de las 224 muestras procesadas se obtuvieron 87 aislados, de los cuales 15 pertenecían al género *Acholeplasma* spp y 72 cepas fueron identificadas como *Mycoplasma* spp., las cuales se identificaron bioquímicamente como *Mycoplasma bovis* 43 (60%), *Mycoplasma californicum* 5 (7%), *Mycoplasma alkalescens* 3 (4%), *Mycoplasma canadense* 2(3%) y *Mycoplasma* spp19 (26%). Y con la PCR se identificaron 33 cepas como *Mycoplasma bovis*. Se estableció una concordancia buena con un valor de Kappa de 0,63 entre las dos técnicas realizadas, por lo que se determinó que el 26 % de los hatos fueron positivos a *Mycoplasma bovis* por la técnica de la PCR. Este es el primer estudio realizado en leche de tanque de almacenamiento de explotaciones de bovinos, para establecer la presencia de *Mycoplasma bovis* por técnicas moleculares en México.

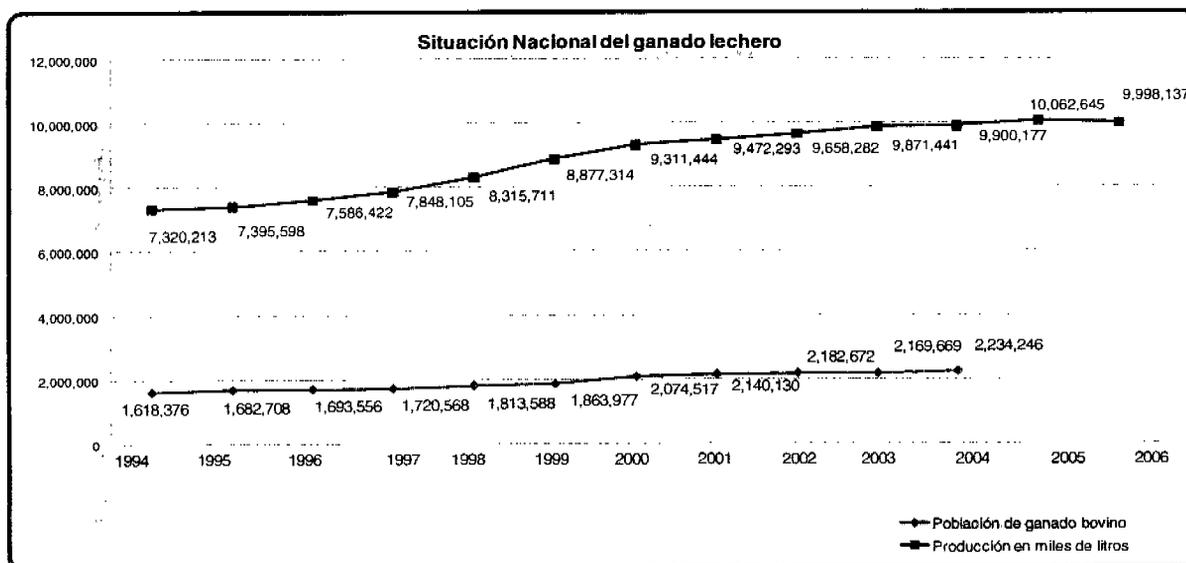
I. INTRODUCCIÓN

1.0 SITUACIÓN NACIONAL DEL GANADO LECHERO EN MÉXICO.

La ganadería nacional año con año ha mostrado un ligero crecimiento, en el caso de bovinos especializados en producción láctea, el ultimo informe que proporciona el SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera 2007) de la SAGARPA (Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación) indica que en la última década la población de bovinos presentó un considerable crecimiento gracias a programas de mejora genética, manejo, desarrollo del hato, técnicas en producción láctea y programas de control sanitario, incluyendo importaciones de ganado de Norte-América.

La SAGARPA en la década de 1994-2004 mostró el incremento en la población bovina lo que se reflejó en el aumento en la producción láctea y señala que en más de una década (1994 al 2006) el aumento en la producción láctea fue de 7 320, 213 litros a 9 996, 137 litros (Fig. 1).

Figura 1 Población y producción del ganado bovino productor de leche de 1994 a 2006, SIAP, SAGARPA 2007.



1.1 MASTITIS

La mastitis es el problema más frecuente y serio en los bovinos productores de leche, ocasionando pérdidas económicas debido a la baja producción láctea, la necesidad de desechar la leche de los animales con lesiones de mastitis (inflamación del tejido de la glándula mamaria que muestra daño epitelial), del diagnóstico bacteriológico, del tratamiento, el desecho y reemplazos de los animales. Se puede clasificar por su forma de presentación en dos tipos principales mastitis clínica o subclínica (Ávila *et al.*, 2004, Kirk and Mellengerber 1995). El National Mastitis Council (NMC) a partir del año 1999 consideró a *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma spp* y *Streptococcus agalactiae* como los microorganismos contagiosos y patógenos primarios causantes de mastitis bovina (Kirk and Mellengerber 1995, NMC 1999, Britten 2006).

1.2 PÉRDIDAS ECONÓMICAS A CAUSA DE MASTITIS

A nivel mundial se ha estimado que la mastitis representa el 30% del costo total de las enfermedades que afectan al ganado lechero (Nicholas *et al.*, 2003). En Estados Unidos y Canadá las pérdidas económicas por mastitis en bovinos en 1996, ascendieron a dos mil millones de dólares que equivalen a 200 dólares por vaca (Crist *et al.*, 1997 NMC).

En México, las pérdidas económicas por concepto de valor al desecho por vaca asociadas con mastitis en 1984, fue de 2.17 millones de pesos (Valdespino 1984).

Tabla 1. Pérdidas económicas por mastitis bovina en diferentes zonas geográficas del mundo.

LUGAR	PÉRDIDAS ECONÓMICAS	REFERENCIA	PROBLEMA
CANADA	1 mil millones dólares año	Soca Pérez <i>et al.</i> , 2003 NMC	Mastitis
USA	2 mil millones dólares año	Soca Pérez <i>et al.</i> , 2003 NMC	Mastitis
UNION EUROPEA	576 millones de euros	Nicholas 2004	Mastitis
MÉXICO	2.17 millones de pesos	Valdespino 1999	Valor de desecho de vacas por mastitis

1.3 MASTITIS POR *Mycoplasma bovis*

La mastitis bovina es causada por varias especies de micoplasmas principalmente por *Mycoplasma bovis* que se considera como el más patógeno, sin embargo se mencionan otras especies involucradas como, *Mycoplasma alkalescens*, *M. californicum*, *M. canadense* y *M. arginini* (Jasper 1981, Miranda-Morales *et al.*, 1999, Ávila *et al.*, 2005).

Mycoplasma bovis esta asociado principalmente a problemas de mastitis, sin embargo se encuentra también ocasionando problemas de neumonía, artritis, abortos y queratoconjuntivitis. La mastitis por *Mycoplasma bovis* se caracteriza por la presentación de cuadros clínicos severos que generalmente afecta a más de un cuarto de la glándula mamaria, con perdida en la producción de leche originando altos costos por tratamientos a los que la mastitis se muestra reincidente. La producción láctea muestra una baja súbita, algunas veces se pueden presentar depósitos con aspecto arenoso lo que afecta negativamente la calidad láctea (Nicholas 2004, Farshid, *et al.*, 2003).

1.4 PÉRDIDAS ECONÓMICAS A CAUSA DE MASTITIS POR *Mycoplasma bovis*.

En la industria lechera, las pérdidas económicas originadas por los problemas de mastitis por micoplasmas se deben principalmente a la disminución súbita en la baja de producción láctea y al desecho de animales con alto registro (Nicholas *et al.*, 2003). En la Unión Europea las pérdidas anuales por mastitis son de alrededor de 576 millones de euros y se ha responsabilizado a *Mycoplasma bovis* de alrededor de 144 millones de euros de pérdidas anuales y en los Estados Unidos en el 2003 Nicholas, reportó 32 millones de dólares como pérdidas económicas a causa de *Mycoplasma bovis* (Tabla 2). En los hatos infectados el microorganismo persiste durante un período prolongado, lo que ocasiona la eliminación de los animales por secuelas de la enfermedad. En muchas ocasiones la severidad de las lesiones es tan grave que muchos animales pierden su valor productivo y económico provocando su eliminación (Jasper 1981).

Tabla 2. Pérdidas económicas a causa de Mastitis por *Mycoplasma bovis*.

LUGAR	PÉRDIDAS ECONÓMICAS	REFERENCIA	PROBLEMA
USA	32 millones dólares	Nicholas <i>et al.</i> , 2003	Mastitis por <i>M. bovis</i>
EUROPA	144 millones euros	Nicholas <i>et al.</i> , 2003	Mastitis por <i>M. bovis</i>

1.5 LECHE DE TANQUE

En la industria lechera la leche se acopia después del ordeño en tanques de almacenamiento que deben estar en condiciones de refrigeración y agitación hasta

su transporte a las plantas procesadoras. La leche almacenada en los tanques permite al ganadero y al médico veterinario realizar diferentes pruebas para obtener información del perfil sanitario del hato. Datos como, el recuento celular somático (RCS), la detección de microorganismos patógenos involucrados en la mastitis, presencia de antibióticos, hormonas en leche, detección de anticuerpos y la presencia de otros patógenos como *Brucella*, *Mycobacterium*, virus de IBR, etc., el estudio de todos estos factores en la leche permite un mejor control sanitario de los hatos (Farnsworth 1993, Agger 1994, Ollis 1995).

El NMC (National Mastitis Council) 1997 indica que para tener un control del hato en cuanto a sanidad, se deben realizar dos muestreos de leche de forma aséptica directamente de la ubre cada trimestre y en el caso de leche de tanque menciona que el muestreo debe ser semanal, quincenal o mensual según el plan de control sanitario de los hatos, el NMC 1999 señala que el tanque de almacenamiento debe permanecer en refrigeración y agitación, la colección de una muestra de tanque se toma de la parte superior del tanque y no de las llaves de salida, se debe colectar como mínimo 30 ml en un recipiente estéril y ser transportadas en refrigeración hacia el laboratorio de diagnóstico (NMC 1999).

1.6 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

El primer informe de aislamiento de micoplasma fue descrito por Nocard y Roux en el año de 1898, de un caso de pleuropneumonía bovina en donde identificaron a *Mycoplasma mycoides* subsp *mycoides*. El primer nombre que recibió *Mycoplasma bovis* fue el de *Mycoplasma bovimastitidis*, posteriormente se le asignó el nombre de *Mycoplasma agalactiae* subespecie *bovis* por su similitud

con *Mycoplasma agalactiae* hasta que el análisis de la secuencia del gen para el RNAr 16s la evidenció como una especie diferente y se le dio el nombre de *Mycoplasma bovis* (Tenk 2005).

Para el año 1962 Hale *et al.*, en los Estados Unidos reportaron el primer aislamiento *M. bovis* de muestras de leche de 25 bovinos con problemas de mastitis subclínica, Carmicheael *et al.*, en el año de 1964 detectaron serológicamente a *M. bovis* de 16 hatos en New York, USA. Desde entonces, se han reportado aislamientos por Bar-Morshe en Israel 1964, por Marcos Barrado y Sanz-Perex en España 1967, Cottew en Australia 1970, Francia 1974, Gran Bretaña 1975, Ruhnke *et al.*, en 1976 Canadá, Alemania 1977, Dinamarca 1981, Marruecos 1988, Corea del Sur 1989, Brasil 1989, Irlanda 1993, Shane C. *et al.*, 1999 en California USA y Chile 2000 (Shane *et al.*, 1999 Nicholas *et al.*, 2003 Farshid *et al.*, 2003 Jasper 1981). Hotzel 1996 estandarizó la técnica de la PCR con una cepa tipo de *Mycoplasma bovis* con la secuencia de la oligopéptido permeasa Opp, metodología que más tarde utilizó Bashiruddin *et al.*, en Inglaterra junto con otras técnicas de la PCR de autores como Dediu *et al.*, 1995, Johansson *et al.*, 1996, Subramaniam *et al.*, 1998, Hotzel and Shane 1998 (clase *Mollicutes*) asimismo utilizaron 10 cepas de referencia de *Mycoplasma bovis* y 15 cepas de referencia de *Mycoplasma agalactiae*, para un estudio comparativo donde se reportó que los iniciadores que codifican para la permeasa Opp que utilizó Hotzel, fue 100 % específico de *M. bovis* sin falsos positivos a diferencia de otras metodologías y otros iniciadores (Tabla 3).

Tabla 3. Antecedentes históricos del aislamiento e identificación de micoplasmas de animales con problemas de mastitis.

AÑO	PAIS	ESTUDIO DE <i>M. bovis</i>	REFERENCIA
1898	Francia	Aislamiento <i>Mycoplasma</i> spp.	Nocard y Roux
1962	U.S.A	Aislamiento <i>M. bovis</i> en animales con mastitis	Hale <i>et al.</i> ,
1964	U.S.A	Serología <i>M. bovis</i>	Carmicheael <i>et al.</i> ,
1964	Israel	*	Bar-Morshe
1967	España	*	Barrado and Sanz perex
1970	Australia	*	Cottew
1974	Francia	*	Nicholas <i>et al.</i> ,
1975	Gran Bretaña	*	Nicholas <i>et al.</i> ,
1976	Canadá	*	Ruhnke <i>et al.</i> ,
1977	Alemania	*	Nicholas <i>et al.</i> ,
1988	Marruecos	*	Nicholas <i>et al.</i> ,
1981	Dinamarca	*	Nicholas <i>et al.</i> ,
1989	Corea del Sur	*	Nicholas <i>et al.</i> ,
1989	Brasil	*	Nicholas <i>et al.</i> ,
1993	Irlanda	*	Nicholas <i>et al.</i> ,
1996	USA	Identificación de <i>M. bovis</i> por medio de PCR	Hotzel <i>et al.</i> ,
2000	Chile	*	Nicholas <i>et al.</i> ,
2005	Inglaterra	Estudio comparativo <i>M. bovis</i> y <i>M. agalactiae</i> por la PCR	Bashiruddin <i>et al.</i> ,

*Aislamiento de *Mycoplasma bovis* de animales con problemas de mastitis.

Después de una revisión bibliográfica exhaustiva, no se encontraron estudios relacionados actualmente con el análisis bacteriológico en leche de tanque para establecer la presencia de micoplasmas y otras bacterias involucrados como patógenos primarios de mastitis. Los estudios realizados en México alrededor de la mastitis bovina por micoplasmas son de leche directa de los cuartos de bovino con mastitis. Ávila *et al.*, en 1983 aislaron a *Mycoplasma*

spp., de un hato lechero del Estado de México. Miranda-Morales *et al.*, en 1995 aislaron a *Mycoplasma* spp de un brote en un hato lechero del estado de Hidalgo, Miranda-Morales *et al.*, 1999 reportaron la patogenicidad de micoplasmas en cultivo celular primario de glándula mamaria involucrados en la mastitis bovina. Asimismo, se han realizado estudios serológicos como Hernández *et al.*, 1995, Infante *et al.*, 2004 que detectaron anticuerpos contra *M. bovis*, así como Núñez *et al.*, 2005, reportó positividad con la técnica de ELISA contra *M. bovis* (Tabla 4).

Tabla 4. Antecedentes históricos del aislamiento e identificación de micoplasmas en animales con problemas de mastitis en México.

AÑO	PAÍS	ESTUDIO DE <i>M. bovis</i>	REFERENCIA
1983	México	Aislamiento de <i>Mycoplasma</i> spp.	Ávila <i>et al.</i> ,
1995	México	Aislamiento de <i>Mycoplasma</i> spp.	Miranda <i>et al.</i> ,
1995	México	serología <i>M. bovis</i>	Hernández <i>et al.</i> ,
2004	México	serología <i>M. bovis</i>	Infante <i>et al.</i> ,
2005	México	serología <i>M. bovis</i>	Núñez <i>et al.</i> ,

Jasper en 1980, en California U.S.A. reportó un brote de micoplasmosis clínica en 104 hatos, en 59 de ellos presentaron *Mycoplasma bovis* y el resto *M. alkalescens*, *M. arginini*, *M. bovirgenitalium*, *M. bovirhinis* y *M. canadense*. Asimismo, Jasper 1980, analizó muestras de leche de tanque y aisló a *Mycoplasma bovis* en un 4 % y *Acholeplasma* como agente contaminante (Jasper 1981). Shane *et al.*, 1999, en California USA identificaron a *Mycoplasma bovis* en leche de tanque con la PCR lograron identificar el 88 % de 25 muestras. El sistema nacional de monitoreo de salud animal del centro de epidemiología y salud animal, del Departamento de Agricultura de U.S.A, en el año 2002 estudiaron la prevalencia de micoplasmas en leche de tanque de algunas regiones

de 21 estados del país donde se muestrearon 871 hatos en total, donde el 7.9 % de los hatos resultaron positivos a *Mycoplasma* spp. De los aislados obtuvieron una prevalencia de *Mycoplasma bovis* del 86% siendo el patógeno con mayor porcentaje y en menor cantidad a *M. californicum*, *M. alkalescens*, *M. canadense* y *M. bovigenitaluim*, y se observó que en 16 de los 21 estados fueron positivos al aislamiento de *Mycoplasma* spp. Filioussis, *et al.*, 2005 en Grecia identificaron a *Mycoplasma bovis* por medio de la PCR en 37 leches de tanque de almacenamiento, donde obtuvieron un 5.4 % de hatos positivos. Fox *et al.*, 2005 reportaron en USA la identificación de *M. bovis* por medio de PCR en 93 leches de tanque de almacenamiento, donde obtuvieron un 70 % de hatos positivos y Richard G *et al.*, 2006 observaron que en 773 muestras de leche de tanque de bovino analizadas se aisló *Mycoplasma* spp. en 1.9 % (Richard *et al.*, 2006).

Tabla 5. Antecedentes históricos del aislamiento e identificación de micoplasmas en leche de tanque.

ANO	PAIS	ESTUDIO DE <i>M. bovis</i>	REFERENCIA
1980	U.S.A	Aislamiento de <i>M. bovis</i> , <i>M. alkalescens</i> , <i>M. arginini</i> y <i>M. canadense</i> .	Jasper
1997	U.S.A	Aislamiento de <i>M. bovis</i> , <i>M. alkalescens</i> , <i>M. arginini</i> y <i>M. canadense</i> .	Kirk <i>et al.</i> ,
1999	U.S.A	Aislamiento <i>M. bovis</i> .	Shane <i>et al.</i> ,
2002	U.S.A	Aislamiento e identificación de <i>Mycoplasma</i> spp. Y <i>M. bovis</i> de leche de tanque de 21 Estados de E.U.A.	Centers for Epidemiology and Animal Health. The National Animal Health Monitoring System. Department of Agriculture (USDA)
2005	Grecia	Identificación de <i>M. bovis</i> por PCR en leche de tanque de almacenamiento	Filioussis <i>et al.</i> ,
2005	USA	Identificación de <i>M. bovis</i> por PCR.	Fox <i>et al.</i> ,
2006	Canadá	Aislamiento de <i>Mycoplasma</i> spp.	Richard <i>et al.</i> ,

1.7 CLASIFICACIÓN TAXONOMICA

Los microorganismos de la clase Mollicutes están considerados como los más pequeños dentro del reino procariote, miden aproximadamente 300 a 500 nm, son pleomórficos, carecen de pared celular por ello se nombran como *Mollicutes* termino que proviene de *mollis* (suave) y *cutis* (piel) (Razin *et al*, 1998).

Dentro de la clase *Mollicutes* se encuentran dos grupos: Los helicoidales y los no helicoidales. En los no helicoidales dependientes de esteroles se ubican los géneros *Mycoplasma* y *Ureaplasma* microorganismos, descritos como patógenos en humanos y animales y los no helicoidales no dependientes de esteroles, los *Acholeplasmas* microorganismos considerados comensales en diferentes especies animales y finalmente los *Spiroplasmas* microorganismos helicoidales que se encuentran identificados en plantas y artrópodos principalmente (Rosendal, 1993; Razin *et al*, 1998).

Los micoplasmas son microorganismos que se localizan en diferentes especies animales: bovinos, caprinos, ovinos, cerdos, aves, perros, gatos y el humano, además se han identificado en reptiles, artrópodos y peces. Se consideran de alta especificidad de especie y se relacionan a problemas del tracto respiratorio, tracto genital, glándula mamaria, articulaciones y conjuntiva (Dybvig 1996).

La LPSN (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclatura) reconoce 122 especies (LPSN 2005), aproximadamente 85 de ellas afectan al hombre y a los animales (Smith 1971, Howard *et al.*, 1994). En los bovinos las

especies de micoplasmas responsables de ocasionar problemas son *Mycoplasma bovis*, *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC (small colony), *M. dispar*, *M. bovirhinis*, *M. canadense*, *M. bovigenitalium*, *M. californicum*, *M. alkalescens*, *M. arginini*, *M. conjunctivae*, y *Ureaplasma diversum*. *Mycoplasma bovis* es causante de mastitis, artritis, problemas respiratorios, problemas oculares e infecciones vaginales en bovinos (Howard WW 1994, Nicholas *et al.*, 2003, Farshid *et al.*, 2003).

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Figura: 4 Clasificación taxonómica *Mycoplasma*

REINO: Procariota

PHYLUM: Scotobacteria

CLASE: Mollicutes

ORDEN I: Mycoplasmatales

ORDEN II:
Entomoplasmatales

ORDEN III:
Anaeroplasmatales

ORDEN IV:
Acholeplasmatales

FAMILIA: Mycoplasmataceae

GÉNERO: *Mycoplasma*

122 Especies (LPSN, 2005)

GÉNERO: *Ureaplasma*

1.9 GENERALIDADES DE MICOPLASMA

Una característica primordial del género micoplasma es la ausencia de pared celular, propiedad que los hace resistentes a los antibióticos β -lactámicos, sensibles a detergentes, generalmente son inmóviles, algunas especies muestran movimiento de deslizamiento y algunas especies son intracelulares.

Los micoplasmas están clasificados como bacterias Gram negativas, se desarrollan en una atmósfera de aerobiosis y microaerobiosis en medio líquido y sólido respectivamente, en medio sólido al 0.8 % de agar las colonias se aprecian con la morfología típica de "huevo frito" (Tully- Razin 1970), miden de 10 a 500 μ m de diámetro, muestran una forma umbilicada, apariencia que se da por la alta densidad en la parte central del medio sólido y menor densidad en la periferia de la colonia (Smith 1971), algunas especies de micoplasmas utilizan carbohidratos como la glucosa, manosa, maltosa y la arginina como fuentes energéticas. Por su delimitado potencial genético, los micoplasmas requieren de una asociación con la célula huésped por lo tanto para su cultivo *in vitro* requieren de medios enriquecidos que deben contener proteínas, esteroides y ácidos grasos, los cuales se adicionan con el suero de equino y/o cerdo los cuales proveen lípidos no tóxicos y protección al unirse con iones metálicos tóxicos.

1.10 CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES:

1.10.1 MEMBRANA:

La membrana de los micoplasmas es trilaminar, rica en lípidos, por lo que se desarrollan *in vitro* en medios enriquecidos con alto contenido de esteroides, fosfolípidos, glicolípidos, proteínas etc. (Eichwald *et al.*, 1973, Razin 1978). La

membrana de micoplasma esta compuesta por un 50-59 % de proteínas, 35-40 % de lípidos y un 2 % de carbohidratos (Maniloff *et al.*, 1972). Las proteínas y lípidos son de gran importancia por interactuar directamente con las células del huésped y con la respuesta inmune. En el caso de los micoplasmas una función de las proteínas es la citoadherencia y los lípidos cumplen con funciones de transporte y estructura (Razin *et al.*, 1998, Dybvig *et al.*, 1996).

1.10.2 PROTEINAS DE SUPERFICIE DE MEMBRANA:

Los Micoplasmas tienen proteínas de superficie llamadas P, Ps (proteínas superficiales de membrana) o VSP (proteínas variables de superficie) que han sido estudiadas para conocer sus funciones y/o respuesta inmunológica (Razin *et al.*, 1998, Dybvig *et al.*, 1996, Rosengarten *et al.*, 1994).

La identificación con anticuerpos de epítomos de moléculas de la familia VSP de cepas patógenas de *Mycoplasma bovis* involucradas al la adherencia en el epitelio indica a P26 como una proteína de adherencia. Así, se ha demostrado que en cultivos de células embrionarias de pulmón de bovino anticuerpos inhiben parcialmente citoadherencia por la P26 (Sacase *et al.*, 2000). Otra función de las VSP de *Mycoplasma bovis* es la posible evasión de la opsonización por anticuerpos específicos (Sachse *et al.*, 2000, Razin *et al.*, 1998). Además de presentar VSP y proteínas estructurales (P) las que tienen la principal función de adhesinas, ubicadas en el citoesqueleto de los micoplasmas como *M. pneumoniae* que tienen la p30, p57, etc. *Mycoplasma bovis* posee la P48 que es una proteína conservada de cuyo gen a sido utilizado para su identificación por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se ha encontrado una homología

con la P48 de *Mycoplasma agalactiae* (Behrens *et al.*, 1994, Robino *et al.*, 2005). Los micoplasmas también cuentan con proteínas transportadoras en la membrana, en el caso de *M. bovis* se presentan tres sistemas ABC, PTS y difusión facilitada. En el sistema ABC trabaja con una o dos proteínas de membranas con dominios conservados denominado cassette de unión de ATP en inglés ATP Binding – Cassette y su sistema consiste en el paso del sustrato pegado a una proteína transportadora con consumo de ATP, este sistema solo se ha descrito en bacterias, el segundo sistema de fosfotransferasa de azúcares consiste en el transporte de carbohidratos modificando la composición química del carbohidrato y el tercero difusión facilitada de sustratos a través de la bicapa lipídica sin que estos sustratos se alteren bioquímicamente (Razin *et al.*, 1998, Zhao *et al.*, 2004). El sistema ABC, se encuentran en varias especies de micoplasmas. Este transporte consta de proteínas acarreadoras de ATP y péptidos, llamadas Opp (Oligopeptido permeasa) las cuales importan oligopeptidos utilizados para la síntesis de ácidos nucleicos (Razin *et al.*, 1998, Behrens *et al.*, 1994, Zhao *et al.*, 2004).

Las permeasas son proteínas que facilitan el transporte de moléculas como Oligopeptidos de un lado a otro de la membrana mediante transporte activo, estas permeasas necesitan consumo de ATP para llevar a cabo su trabajo. Las secuencias de los genes de las permeasas OppD y OppF han sido utilizadas para diferenciar a *Mycoplasma bovis* de otras especies de este debido a que *Mycoplasma bovis* presenta la secuencia conservada, a diferencia de las permeasas en *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp, *E. coli* incluyendo varios

micoplasmas (Dybvig *et al.*, 1996, Razin *et al.*, 1998, Hopfe *et al.*, 2003, Asiya *et al.*, 2003).

110.3 LÍPIDOS DE SUPERFICIE DE MEMBRANA:

La membrana contiene fosfolípidos, glucolípidos, lípidos neutros (almacenamiento energético) o lípidos estructurales, esteroides y lipoproteínas, también cuenta con lípidos membranales como el fosfatidilglicerol o PG la cual es importante en la estabilidad de la membrana (Behrens *et al.*, 1994, Razin *et al.*, 1998, Sachse *et al.*, 1999).

Los esteroides son los principales lípidos que contienen las células eucariotas en micoplasma por su ausencia de pared celular los esteroides son parte fundamental de su estabilidad osmótica (Razin *et al.*, 1998).

1.11 REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES

Los micoplasmas requieren para su cultivo *in vitro* características y condiciones atmosféricas específicos, por su complejidad se considera un microorganismo fastidioso, requieren para su crecimiento una cantidad abundante de esteroides proporcionados por el suero de equino o cerdo, son quimioorganotrofos, que utilizan a los azúcares y/o a la arginina como fuente de energía. El medio comúnmente utilizado para su cultivo es el medio Hayflick basado en el medio Edwards 1956, que contiene una base de peptona con infusión de cerebro-corazón PPLO (organismos asociados a pleuroneumonía) enriquecido con glucosa, extracto de levadura y un pH de 7.5, más la fuente de esteroides que se adicionan en el suero equino. Para algunas especies de micoplasmas de crecimiento más fastidioso, se tienen medios de cultivo más enriquecidos como lo

es el medio Friis, que se utiliza para micoplasmas en cerdo, al cual se le adiciona una solución de sales, para una mejor estabilidad de osmolaridad, suero de cerdo y suero de equino. El medio Frey se utiliza para micoplasmas en aves al que se le adiciona Dinucleotido de nicotinamida y adenina (NAD), cisteína y suero de cerdo (Howard *et al.*, 1994).

1.12 ACTIVIDAD METABOLICA

Muchos de los micoplasmas degradan los carbohidratos con la producción de ácido láctico y ácido acético, similar a las demás bacterias. Otras especies utilizan la β -oxidación para la oxidación de ácidos y utilizan el ciclo del ácido tricarboxílico para generar acetatos. Otras especies más convierten la arginina en ornitina por la arginina desaminasa y el género *Ureaplasma* que hidroliza la Urea (Smith 1971, Howard *et al.*, 1994). Algunos micoplasmas utilizan los ácidos grasos exógenos para sintetizar los fosfolípidos y glicolípidos de su membrana y otros micoplasmas incorporan a su membrana ácidos grasos preformados por el huésped (Smith 1971).

La identificación de los micoplasmas por pruebas bioquímicas requiere mucho tiempo y en ocasiones los resultados son difíciles de interpretar es necesario consultar las pruebas establecidas por el Subcomité sobre la taxonomía de *Mycoplasmas* (Howard *et al.*, 1994) con el fin de utilizar las pruebas bioquímicas recomendadas y lograr una adecuada interpretación de estas, ya que algunas veces solo una prueba nos diferencia alguna especie como lo muestra la tabla 6.

Tabla 6. Características bioquímicas y tamaño del genoma del género *Mycoplasma*.

	G	M	A	T	H	C	F	P/M	GENOMA (Kb)
<i>M. bovis</i>	-	-	-	+ / +	X	-	+	+	1100
<i>M. alkalescens</i>	-	+	+	- / -	-	-	+	-	735
<i>M. californicum</i>	-	-	-	- / -	X	-	+	-	1,070
<i>M. canadense</i>	-	-	+	- / -	+	-	+	-	=====
<i>M. bovigenitalium</i>	-	-	-	- / -	X	-	+	X	955
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>Mycoides LC</i>	+	+	-	+ / +	-	+	-	-	1280
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>Mycoides SC</i>	+	+	-	+ / +	-	+	-	-	1280
<i>M. arginini</i>	-	-	+	- / +	-	-	-	-	735
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>capri</i>	+	+	-	+ / +	-	+	-	-	758
<i>Mycoplasma</i> grupo 7	+	+	-	+ / +	-	+	-	-	1,120

G: Glucosa
M: Manosa
A: Arginina
T: Tetrazolio aeróbio / anaerobio
C: Caseína
H: Hemoadsorción
F: Fosfatasa alcalina
P/M: Películas y Manchas
X: No Aplica

1.13 FACTORES DE VIRULENCIA Y PATOGENICIDAD DE

Mycoplasma bovis.

La infección por micoplasma se caracteriza por 3 aspectos importantes.

1. Enfermedad septicémica, 2. Diseminación por sangre seguida por inflamación de cavidades y articulaciones, 3. Enfermedad local del aparato respiratorio, genital, glándula mamaria y conjuntiva (Gyles1993).

Mycoplasma bovis puede tener una interacción en un largo periodo con las células de hospedero causando efectos citopáticos, Farshid *et al.*, 2003 mencionan que *Mycoplasma bovis* induce la producción del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) que sugiere la respuesta inflamatoria en procesos de micoplasmosis por *Mycoplasma bovis* además de mencionar la evidente evasión de la respuesta inmune del huésped. Así como las abundantes lipoproteínas antigénicas que se expresan en esta especie (Farshid *et al.*, 2003).

Mycoplasma bovis es capaz de ocasionar la disfunción celular en el tejido de la glándula mamaria por la liberación de metabolitos como los iones peróxido, super-óxido fosfolipasas, ureasas, proteasas, hemolisinas y nucleasas que dañan de forma localizada la integridad de la membrana celular del huésped (Tenk 2005). La mastitis por *Mycoplasma bovis* tiene una presentación clínica crónica que se caracteriza por fibrosis, necrosis, exudados con infiltración de macrófagos y neutrofilos. En la presentación aguda la glándula mamaria muestra un exudado seropurulento persistente que no responde al tratamiento, lo que condiciona a una mastitis reincidente (Jasper 1981, Farshid *et al.*, 2003). Cuando la infección se torna crónica después de 2 a 3 semanas post-infección se observa una atrofia alveolar con infiltración intersticial de linfocitos y macrófagos (Miranda-Morales 1999, Dybvig *et al.*, 1996, Jasper 1981, Farshid *et al.*, 2003). En el caso de la mastitis subclínica, la glándula mamaria no presenta cambios aparentes, solo la baja súbita en la producción de leche por *Mycoplasma bovis* se vuelve crónica y reincidente, por esto es necesario el monitoreo general del hato antes que individual (Kirk 1995).

Se han observado explotaciones de bovinos infectados con *M. bovis*, que presentaron una mortalidad del 10% y una morbilidad hasta del 80%, cuando el cuadro respiratorio esta asociado a la mastitis (Nicholas, *et al.*, 2003 Farshid *et al.*, 2003, Miranda-Morales *et al.*, 1994).

1.13.1 TOXICIDAD

M. bovis produce 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, así mismo, los micoplasmas compiten por aminoácidos, ácidos grasos, cofactores y vitaminas, alterando la integridad y funcionamiento de las células del huésped (Razin *et al.*, 1998).

1.13.2 ADHERENCIA:

La adherencia es el principal mecanismo de patogenicidad que utilizan los micoplasmas para colonizar al huésped y es considerado el primer paso en la infección. La adherencia esta dada por las adhesinas que son proteínas localizadas en la superficie de la membrana de micoplasma (Thomas *et al.*, 2002), como las que presenta *M. genitalium*, *M. pneumoniae* y *M. gallisepticum* P1, MgPa y P30 respectivamente.

Las adhesinas responsables de la citoadherencia, son un proceso que involucra proteínas accesorias de membrana que incluso facilitan el movimiento lateral (Razin 1998). Los receptores sobre la membrana de la célula huésped son los responsables de que los micoplasmas se puedan adherir y están identificados como sialoglicoconjugados y glucolípidos conjugados. El contacto de micoplasma

con la membrana de la célula huésped crea un micro-ambiente que facilita la acumulación de los productos del metabolismo de micoplasma como radicales superóxido y peróxidos los que causan la oxidación de las membranas celulares del huésped (Razin 1998 y Jacob 1992).

Mycoplasma bovis y *M. canadense* tienen la capacidad de citoadherirse *in vitro* a células epiteliales de la glándula mamaria de bovino, después de 30 minutos de incubación a 37°C, reconociendo receptores de la célula huésped (Miranda-Morales 1999). Algunas especies de Micoplasmas llevan a cabo un proceso de adherencia en los eritrocitos del huésped llamada hemoadsorción que es un claro ejemplo del trabajo de las adhesinas, Howard *et al.*, 1994, menciona que algunos micoplasmas hemoadsorben eritrocitos de cuye y bovino, capacidad trascendente para la identificación de algunas especies.

1.14 CARACTERÍSTICAS MOLECULARES

El genoma de los *Mycoplasmatales* es de 600-2.200 kb, correspondiente a 600-800 genes, que se le considera el mínimo necesario para tener vida independiente (Smith 1971, Dybvig *et al.*, 1996).

El ADN de los micoplasmas es pobre en guanina (G) y citosina (C) (18-40%) y rico en adenina (A) y timina (T) (60-80%). Además, este género produce un alto nivel de enzimas degradativas como las nucleasas y las proteasas, características importantes en la realización de pruebas moleculares. Otra diferencia significativa con algunas bacterias es que los micoplasmas leen el codón UGA como triptofano y *E. coli* lo lee como codón de término. La secuencia de los genes del RNAr 16S muestran alta relación con el género *Clostridium* y se

sugiere que los micoplasmas podrían ser relacionados como una forma evolutiva de este género (Dybvig *et al.*, 1996). Por ejemplo la secuencia del ARNr subunidad 16S muestra una pequeña diferencia de 8 nucleótidos entre algunas especies del grupo *Mycoplasma mycoides* (Razin, 1998, Tenk M 2005). En 1987 Cottew *et al.*, demostraron que algunas especies de micoplasmas están relacionadas filogenéticamente, siendo clasificadas dentro del mismo grupo por sus características, un ejemplo de esto es el "grupo *mycoides*", esta relación la establecieron con pruebas bioquímicas convencionales, reacciones inmunológicas, hibridación del ADN, análisis de la secuencia de genes del ARNr 16S por medio de la técnica de PCR (Thiaucourt *et al.*, 2000; Nicholas, 2002). Es así, que 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 ribosomal de la subunidad 16S (Peyraud *et al.*, 2003).

1.15 TRANSMISIÓN DE *Mycoplasma bovis*.

Una incorrecta higiene al ordeño puede contagiar al resto del hato ya sea por las maquinas de ordeño o por el manejo de los ordeñadores *Mycoplasma bovis* puede encontrarse en el tracto respiratorio de animales enfermos o portadores sanos, por lo que puede ser transmitido por descargas nasales, o aerosoles, también lo encontraremos en leche de animales portadores con la que se alimenta a los becerros lo que puede ocasionar problemas respiratorios (Tenk 2005).

1.16 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la micoplasmosis se realiza con técnicas bacteriológicas, serológicas y recientemente las técnicas moleculares.

Las técnicas bacteriológicas se basan en el aislamiento del microorganismo en medios enriquecidos y en la identificación bioquímica en laboratorios especializados, el tiempo de crecimiento puede variar desde 1 a semanas que requieren por lo menos de 30 días para lograr la tipificación, se utilizan diferentes pruebas para la identificación de género como la morfología de la colonia, reversión de formas Lister (L), filtrabilidad en 0.45 μm , requerimientos de esteroides. Para la determinación de las especies se realizan pruebas bioquímicas como glucosa, manosa, fructosa, inositol, dulcitol, hidrólisis de la arginina, hidrólisis de la urea, actividad de la fosfatasa, películas y manchas, producción del tetrazolio (aerobio y anaerobio), hidrólisis de la gelatina, digestión del suero coagulado, caseína y la hemoadsorción. Estas técnicas requieren de tiempo hacen del diagnóstico un proceso lento y costoso.

Las técnicas serológicas, se basan en la detección indirecta de anticuerpos específicos en el suero por medio de una reacción antígeno-anticuerpo, permitiendo evaluar el grado de exposición de una población a un antígeno. La inmunofluorescencia es una técnica para detectar la presencia del antígeno, que requiere de anticuerpos monoclonales específicos y de conjugados, lo cual hace a esta técnica muy complicada (Jasper 1981). Otra prueba utilizada es la aglutinación directa o indirecta, ya que diversas especies animales tienen la capacidad de crear anticuerpos aglutinantes que evidencian la infección por micoplasmas (Freundt y Edward 1979).

Las técnicas moleculares utilizadas en el diagnóstico de micoplasmosis son basadas en amplificación de segmentos de ARNr de la 16S, patrones electroforéticos de proteínas y secuencias de nucleótidos. Existen hasta ahora diferentes trabajos a nivel molecular como el estudio patrones electroforético de las proteínas de cada especie de micoplasmas. Por otra parte la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es considerada la técnica más sensible para la detección de diferentes agentes como bacterias, virus y parásitos, la PCR es una técnica que genera *in vitro* numerosas copias de un fragmento de ADN a partir de un bajo número de microorganismos. En esta técnica se requiere de dos iniciadores de oligonucleótidos (Primers) complementarios a las secuencias situadas en los extremos del fragmento de ADN que se va amplificar, para ello se extrae el ADN de la muestra y se desnaturaliza la doble hélice de ADN aplicando ciclos repetidos de elevadas temperaturas y se realiza la hibridación de los dos iniciadores de las secuencias complementarias para la síntesis de ADN

por la enzima ADN polimerasa (Riffon *et al.*, 2001, Mc Auliffe *et al.*, 2003, Filioussis *et al.*, 2005, Ghadersohi *et al.*, 2005). Se han realizado diferentes protocolos para realizar la técnica de la PCR para la identificación de *Mycoplasma bovis*, a partir de cepas aisladas y directamente de leche, los cuales han demostrado diferente sensibilidad y especificidad (Subramaniam *et al.*, 1998 Hotzel *et al.*, 1999, Shane, *et al.*, 1999, Pinnow *et al.*, 2001, Bashiruddin *et al.*, 2005, Ghadersohi *et al.*, 2005).

Es necesario establecer técnicas diagnósticas rápidas, sensibles y específicas como la PCR para la identificación de micoplasmas y llevar a cabo un control y prevención de este tipo de enfermedades (Bashiruddin *et al.*, 2005, Hotzel *et al.*, 1999, Hirose *et al.*, 2001).

1.17 PREVENCIÓN Y CONTROL PARA *Mycoplasma bovis*

Probablemente el origen más común del problema de la micoplasmosis bovina, es debido por la introducción de animales nuevos ya infectados en el hato, las medidas de cuarentena y los monitoreos frecuentes en leche de tanque almacenamiento o de recolección pueden ser disposiciones que evitarán una infección de todo el hato.

A nivel de producción la prueba que se realiza en México para el control de mastitis subclínica es la prueba de California la cual, utiliza el detergente alil lauril sulfonato de sodio y el colorante bromo cresol. Los antisépticos recomendados para el control no solo de micoplasma pero efectivo para este microorganismo, son los agentes que afectan la osmolaridad de su membrana algunos jabones que contienen 2 % de hexaclorofeno ejercen efectos letales. Como desinfectantes se

utiliza el fenol (5 %), formalina (2%), lejía de sosa (4%), agua de cal diluida, 2% de cloro activo, cresoles, metales pesados etc (Jasper 1981).

La temprana detección de micoplasmosis en un hato puede ser por medio de un programa de monitoreo de los tanques de almacenamiento y del cultivo de las muestras de leches mamitosas con la finalidad de evitar la infección de los animales, ya que los tratamientos no han sido tan efectivos hasta ahora (Howard *et al.*, 1994).

1.18 TRATAMIENTOS PARA *Mycoplasma bovis*

Debido a que los micoplasmas carecen de pared celular son resistentes a los β -lactámicos y son sensibles a los antibióticos que actúan inhibiendo la síntesis de proteínas y los que afectan la síntesis de ácidos nucleicos. Los más recomendados para su uso son, enrofloxacin, (quinolona) ciprofloxacina, ofloxacina, levofloxacina (fluroquinolonas) clindamicina, oxitetraciclina (tetraciclina), eritromicina, dirithromicina, tilosina (macrólidos), estreptomycin (aminoglucósido) y lincomicina (lincosamida). Sin embargo estos quimioterapeúticos tienen un efecto bacteriostático para *Mycoplasma*, establecer un tratamiento ayuda a controlar la enfermedad, en ocasiones se eliminan los signos clínicos, pero los animales quedan como portadores sanos, lo que dificulta la erradicación de la enfermedad (Dybvig *et al.*, 1996, Fox *et al.*, 2005 Illner *et al.*, 1973).

JUSTIFICACIÓN

La frecuencia con la que *Mycoplasma bovis* se encuentra relacionado con problemas crónicos de mastitis y ocasionando pérdidas económicas, es común encontrarlo como agente causal primario, en EEUU Jasper 1980 y Shane C. *et al.*, 1999 reportaron un 4 % y 88%, respectivamente a *Mycoplasma bovis*, el Departamento de agricultura de USA 2002 identificó 86% de prevalencia en hatos con problemas de mastitis aisladas en leche de tanque.

El muestreo en leche de tanque permite conocer la situación sanitaria del hato en general, la calidad de la leche y que la metodología para la toma de muestra es muy sencilla y rápida. Esto conlleva a procesar un menor número de muestras y reduce los costos por monitoreo del hato.

El análisis que se realizó en este trabajo se orientó hacia los tanques de almacenamiento para identificar a los hatos positivos al aislamiento de micoplasmas y tipificar mediante pruebas bioquímicas y moleculares por medio de la PCR para identificar a *Mycoplasma bovis* de los aislados de *Mycoplasma spp*, ya que este microorganismo está identificado como patógeno primario en problemas de mastitis haciendo su identificación diagnóstica más eficiente. Por lo que en este estudio, para las cepas aisladas la identificación de *Mycoplasma bovis* se realizó por medio de la PCR con los iniciadores PpMB920-1 y PpMB920-2 que amplifican los genes que codifican para las proteínas de membrana permeasa (oppD) y (oppF), que han presentado un 100 % de especificidad para la identificación de *M. bovis* (Hotzel 1999). El monitoreo favorecerá el control higiénico de los hatos por medio de la revisión en tanques de almacenamiento.

II. HIPÓTESIS

-La identificación molecular de cepas de *Mycoplasma bovis* mediante la técnica de PCR detectará un porcentaje alrededor del 50 % en muestras de leche de bovino colectadas en tanque de almacenamiento.

III. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

-Detectar las especies de *Mycoplasma* spp. en muestras de leche de tanque de almacenamiento por medio de aislamiento e identificación bioquímica y establecer la presencia de *Mycoplasma bovis* mediante la PCR como patógeno primario de la mastitis bovina.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar *Mycoplasma* spp. de muestras de leche de tanque de almacenamiento.
- Tipificación bioquímica de los aislados de *Mycoplasma* spp., para identificar las especies involucradas en mastitis.
- Identificación molecular de las cepas de *Mycoplasma bovis* aisladas de leche de tanque mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

IV. MATERIAL Y METODOS

4.0 ZONA DE MUESTREO

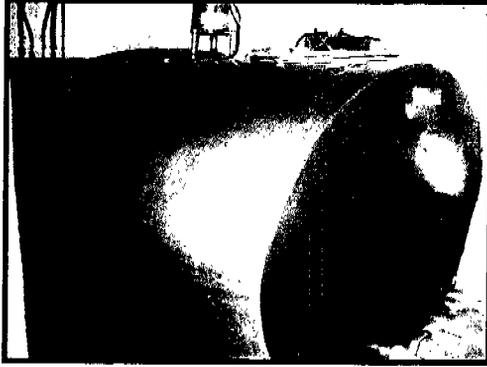
El muestreo fue realizado en el Municipio de Tizayuca Estado de Hidalgo, localizado a 52 kilómetros de la ciudad de México. Está situado a los 19° 50 ' de latitud Noreste y 98° 59', de longitud Oeste del Meridiano de Greenwich, a una altura de 2, 260 metros sobre el nivel del mar, colinda al Norte con Tolcayuca y Estado de México y al Sur y Oeste con el Estado de México, cuenta con una extensión territorial de 92. 5 kilómetros cuadrados.

La población bovina aproximada en la cuenca es de 17, 991 animales distribuidos en 132 hatos con una población promedio de 300 animales cada hato, los animales especializados en producción de de leche y algunos en la cría de becerras de la raza Holstein. Cada hato cuenta con tanques de almacenamiento con una capacidad de 5 000 y/o 10 000 litros, los cuales se mantienen en refrigeración y agitación la leche de uno a dos días antes de su recolección.

4.1 COLECCIÓN DE MUESTRAS

Se tomaron 224 muestras de leche de bovino de tanque de almacenamiento en agitación y refrigeración de un total de 112 hatos. Se realizó un muestreo doble con un intervalo de 15 días, en los meses de julio y agosto del año 2006. Las muestras se colectaron en condiciones óptimas de asepsia, para evitar la contaminación externa, se tomaron en recipientes estériles, de la parte superior del tanque como lo indica el Nacional Mastitis Council (2002), se transportaron a 4°C y se almacenaron a -20 °C.

Figura 1. Tanque de recolección de leche.



4.2 AISLAMIENTO

4.2.1 MEDIO DE CULTIVO

Para el aislamiento de los micoplasmas se utilizó el medio de cultivo de Hayflick modificado (Hayflick, 1965)(Apéndice 1). El cual se basa en el medio básico de Edward (1947) hecho a base de peptonas principalmente usando como base el medio de cultivo PPLO¹ (organismos asociados a pleuroneumonía), al cual se le adicionó, suero de equino, extracto de levadura¹, glucosa², antibiótico (penicilina) y como indicador de pH el rojo de fenol³.

4.2.2 CONTROL DE MEDIO DE CULTIVO

Para verificar que el medio de cultivo de Hayflick permite el desarrollo de micoplasmas bovinos que pueden ser aislados en muestras de leche de tanque, se probaron las siguientes cepas como controles.

1. Cepas tipo de micoplasmas:
 - a. *Mycoplasma bovis* cepa donneta⁴
 - b. *Mycoplasma* del grupo *mycoides*

¹ Lab. DIFCO

² Lab. GIBCO

³ Lab. MERCK

⁴ Donada por la Universidad de Arhus Dinamarca

4.2.3 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las muestras de leche se descongelaron y posteriormente se incubaron durante 1 hora a 37°C para permitir que se liberen las bacterias englobadas en grasa y se siguió la metodología establecida por Tully *et al.*, 1983.

Se tomó un volumen de 200 µl de leche y se depositaron en 1.8 ml de medio Hayflick líquido, se realizaron diluciones decimales de la 10⁻¹ hasta 10⁻⁴ y se incubaron⁵ en aerobiosis a 37° C de 24 a 48 horas. Al mismo tiempo se inocularon 30 µl de muestra de leche en medio Hayflick sólido (Apéndice 1) y se incubó de 48 horas hasta 7 días en microaerobiosis⁶ a 37° C con el 80-85 % de humedad. Las diluciones se revisaron cada 24 horas hasta observar cambio de pH y/o turbidez, las diluciones que presentaron cualquiera de las dos reacciones, se sembraron en placas de medio sólido Hayflick y se incubaron en microaerobiosis⁶ a 37° C con el 80-85 % de humedad. Las diluciones que no mostraron cambio de pH y/o turbidez se subcultivaron a los 7 días en medio Hayflick líquido, este procedimiento se realizó hasta por 4 veces para considerar una muestra como negativa (Ruhnken y Rosendal, 1994). Las cajas de medio sólido fueron observadas cada 24 horas durante 7 días con la ayuda de un microscopio estereoscópico⁷ para distinguir colonias con morfología típica de Micoplasmas (Tully *et al.*, 1983).

Purificación de la cepa: A partir de una placa de medio sólido con colonias de micoplasmas desarrolladas, se tomaron tres colonias perfectamente aisladas con una pipeta Pasteur estéril, cada colonia se sembró en 2 ml de medio líquido

⁵ Incubadora FORMA SCIENTIFIC

⁶ Jarra de anaerobiosis BBL e Incubadora FORMA SCIENTIFIC

⁷ Microscopio ZEISS

de Hayflick y se incubó en aerobiosis a 37° C de 24 a 48 horas hasta observar cambio de turbidez y/o pH, consecutivamente se subcultivó en medio sólido y se incubó en microaerobiosis⁵ con la temperatura y humedad ya mencionada. Este procedimiento fue repetido por tres ocasiones con el fin de obtener un cultivo puro proveniente de una colonia clonada (Tully 1983).

4.3 IDENTIFICACIÓN DE GÉNERO

A partir de un cultivo de cada cepa con 24 horas de incubación se realizaron las pruebas para determinar el género bacteriano.

4.3.1 MORFOLOGÍA DE COLONIA

La morfología de colonia típica de *Mycoplasma* se observó como un halo externo y un punto central en el medio de cultivo sólido de Hayflick.

4.3.2 FILTRABILIDAD

La filtrabilidad se realizó con una membrana de poro de 0.45 µm de diámetro colocada en un portafiltro⁸ estéril, se pasó a través del filtro 2 ml de cultivo líquido. El filtrado posteriormente se sembró en medio sólido Hayflick para comprobar el crecimiento de las colonias de micoplasmas que pasaron por este poro (Tully 1983).

4.3.3 REVERSIÓN DE FORMAS “LISTER”

Esta prueba se realizó, para confirmar la morfología típica de huevo frito y no la presencia de una forma L que por algún inhibidor evitara el desarrollo de la pared celular. Se realizó quitando inhibidores del medio de cultivo en medio líquido

⁸ Millipore

y sólido para observar el desarrollo de colonias con morfología de micoplasmas (Howard *et al.*, 1994).

4.3.4 REQUERIMIENTOS DE ESTEROLES

La prueba de la digitonina se realizó para demostrar la dependencia de esteroides de los micoplasmas, lo que diferencia a los géneros *Mycoplasma* y *Acholeplasma*. Se utilizó una placa de medio sólido y discos de papel filtro saturados con una solución de digitonina al 1,5% con etanol absoluto, se cultivaron cepas de 24 horas de incubación, se les realizaron 3 diluciones decimales 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} de cada una de ellas se tomó 30 μ l y se depositó en el medio sólido haciendo una línea de en la superficie, posteriormente se colocaron los discos de papel filtro impregnados con 0.025 ml de digitonina en el centro de la línea por donde corrió el inóculo y se incubó en microaerobiosis a 37° C con el 80-85 % de humedad, el resultado se observó cuando el género *Mycoplasma* que es dependiente de esteroides y se observó un halo de inhibición del crecimiento que evidencia la diferencia del género *Acholeplasma* que no es dependiente de esteroides y creció alrededor del papel filtro impregnado con digitonina (Tully, 1983, Howard *et al.*, 1994).

4.4 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE ESPECIES DE MICOPLASMAS

4.4.1 PRUEBAS BIOQUÍMICAS

A las cepas identificadas como género *Mycoplasma* spp. se les realizaron las pruebas bioquímicas para determinar la especie que son las siguientes:

Fermentación de carbohidratos como la glucosa, manosa, hidrólisis de arginina y caseína, producción de películas y manchas, reducción de tetrazolio.

Tabla 5. Pruebas bioquímicas para la identificación de especies de Micoplasmas.

Pruebas bioquímicas para identificación de especies Micoplasmas asociados a mastitis						
	G	M	A	T	P y M	C
<i>M. bovis</i>	-	-	-	+ / +	+	-
<i>M. alkalecens</i>	-	+	+	- / -	-	-
<i>M. californicum</i>	-	-	-	- / -	-	-
<i>M. canadense</i>	-	-	+	- / -	-	-
<i>M. bovigenitalium</i>	-	-	-	- / -	x	-
<i>M. mycoides sub mycoides</i>	+	+	-	+ / +	-	+

G: Glucosa
M: Manosa
A: Arginina
T: Tetrazolio aerobio/anaerobio
P y M: Películas y Cristales
C: Caseína

4.4.1 FERMENTACIÓN DE GLUCOSA

Para la fermentación de la glucosa, se realizó la metodología como lo indica Howard 1994, en el medio de cultivo Hayflick con glucosa al 50%. Se prepararon alícuotas en tubos con 1 ml de medio Hayflick con glucosa al 50 % y se inocularon con 1 ml. del cultivo de micoplasma de 24 horas de incubación, se utilizaron dos controles negativos un tubo con glucosa al 50% y un tubo sin glucosa para control del medio todos los tubos se incubaron en aerobiosis a 37° C de 24 horas hasta 15 días, verificando previamente el crecimiento de las cepas.

En una reacción positiva se observó un cambio de pH en el medio de cultivo virando el medio a un color amarillo. Una reacción negativa se observó sin cambio de pH en un tiempo de 15 días de incubación.

4.4.2 FERMENTACIÓN DE MANOSA

Para la fermentación de la manosa, se utilizó medio de cultivo Hayflick con manosa al 50%, como control negativo se usaron dos tubos, uno con manosa al 50 % sin inocular y uno sin manosa como control del medio de cultivo (Howard 1994). Se inoculó 1 ml del cultivo de micoplasmas de 24 horas de crecimiento en 1 ml de medio Hayflick con manosa al 50% y junto con los controles se incubaron en aerobiosis a 37° C de 24 horas hasta 15 días máximo. Se verificó previamente el crecimiento de las cepas, una reacción positiva se consideró cuando se observó un cambio de pH, virando a color amarillo. Una reacción se consideró como negativa cuando no se observó un cambio de pH máximo en un tiempo de 15 días de incubación.

4.4.3 HIDRÓLISIS DE ARGININA

Para la prueba de la hidrólisis de arginina, se agregó arginina (0,2%) en el medio de Hayflick y se inoculó con 0.05 ml de un cultivo de micoplasmas de 24 horas de incubación en tubos con 1.8 ml de medio de cultivo Hayflick con arginina además de incubar los controles negativos, uno con arginina y el otro sin arginina como control del medio de cultivo y se incubaron en aerobiosis a 37°C de 24 horas hasta 15 días máximo. Se verificó previamente el crecimiento de las cepas. Una reacción positiva se consideró cuando se produjo un cambio de pH observando una coloración alcalina (rojo) y se consideró una reacción negativa cuando no se observó cambio de pH o cambio de coloración en un tiempo máximo de 15 días.

4.4.4 HIDRÓLISIS DE LA CASEÍNA

Algunas cepas de micoplasmas llevan acabo la proteólisis de la caseína, prueba que es útil para la identificación de micoplasmas la cual se realizó agregando 32 gramos de leche descremada por cada 100 ml de agua destilada estéril, de la cual se agregó 1 de 7 partes de medio de cultivo. Se inocularon 30 µl del cultivo de micoplasmas de 24 horas de incubación y se incubó en microaerobiosis a 37 ° C con 80 a 85 % de humedad, en una reacción positiva se observó la hidrólisis de la caseína como una zona clara en el lugar donde creció la colonia y una reacción negativa se observó sin cambio alrededor de la colonia. En el caso de *Mycoplasma bovis* es negativo a la proteólisis de la caseína, y la especie *M. mycoides* subsp *mycoides* LC, reacciona positivamente (Ruhnke y Rosendal, 1994).

4.4.5 REDUCCIÓN DEL TETRAZOLIO

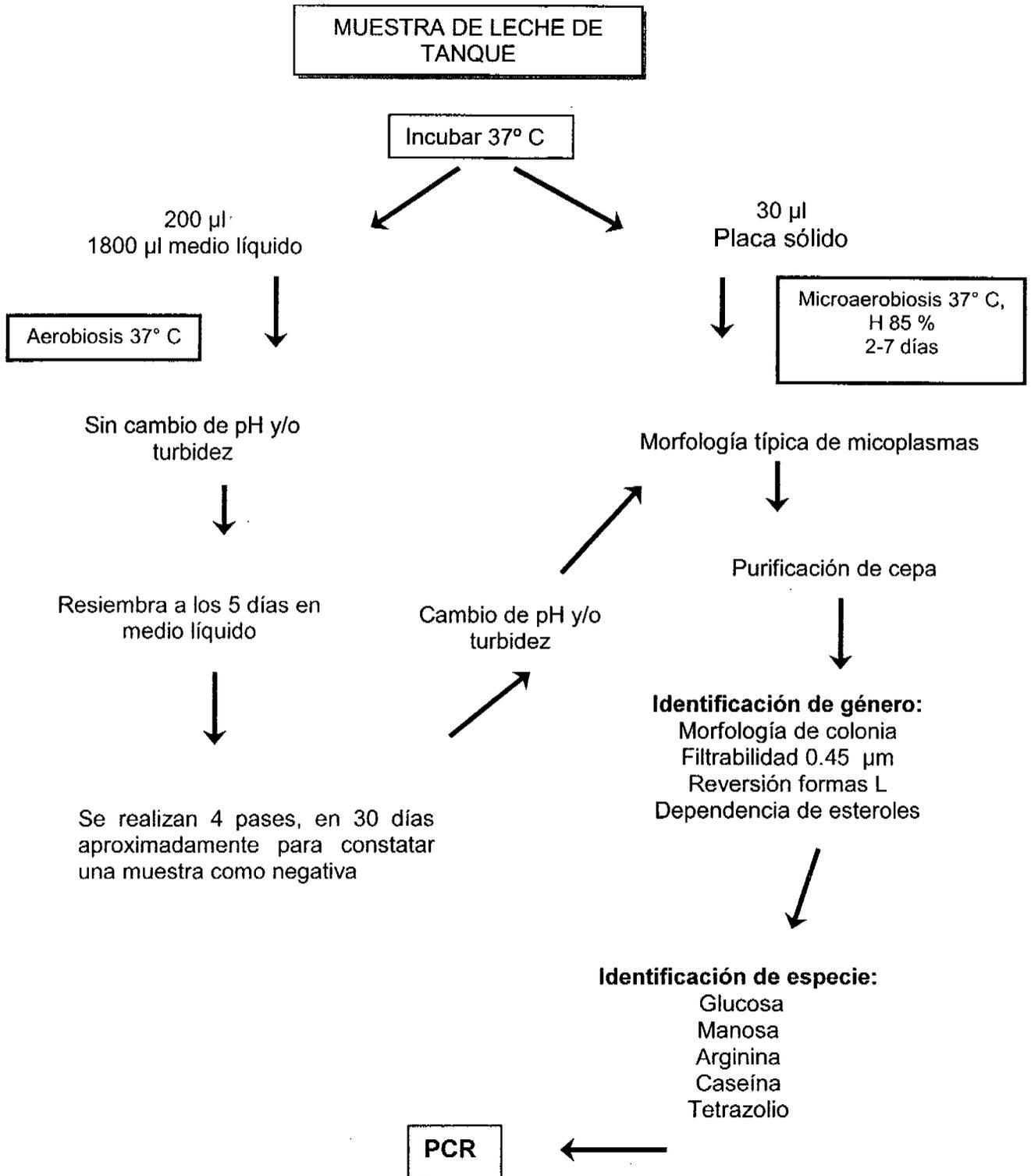
Esta prueba se realizó para demostrar la actividad del metabolismo de algunos micoplasmas cuando el medio contiene el reactivo de tetrazolio que actúa como receptor de electrones, se reduce y toma una coloración roja el medio de cultivo. Se realizó agregando 0,2% de 2, 3, 5-trifenil-tetrazolio tanto en el medio líquido como en el sólido. Se depositaron 200 µl de cultivo en 1.8 de medio Hayflick líquido con tetrazolio y se incubó a 37°C de 24 horas hasta dos semanas. Un resultado positivo se observó con la aparición de un halo rojizo en el medio líquido. Igualmente se incubaron los controles negativos un tubo con tetrazolio y un tubo sin el reactivo y se incubo en las mismas condiciones. Para el medio sólido se utilizaron placas de medio Hayflick con 0,2% de 2, 3, 5-trifenil-tetrazolio y

se incubó en microaerobiosis a 37 ° C con 80 a 85 %, un resultado positivo se observó con la aparición de una coloración rosa a rojo púrpura intenso alrededor de las colonias de micoplasmas. La mayoría de las especies del grupo mycoides presentan reacción positiva a esta prueba incluyendo *M. bovis*. Una reacción negativa se consideró máximo a los 15 días sin cambios de coloración.

4.4.6 PRODUCCIÓN DE PELÍCULAS Y CRISTALES.

La producción de películas y cristales es una característica de algunas especies de micoplasmas que se observa más fácilmente alrededor de colonias desarrolladas en el medio sólido que contiene 20% de suero (Freundt and Edward 1976). La película producida en la superficie del medio está compuesta de colesterol y fosfolípidos. Los cristales son depósitos de sales de calcio y de magnesio procedentes de los ácidos grasos que son liberados por la actividad lipolítica de los micoplasmas (Freundt and Edward 1976).

METODOLOGIA DEL AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE MYCOPLASMA



4.5 OBTENCIÓN DEL CONCENTRADO DE CEPAS DE *Mycoplasma* spp. Y *Mycoplasma bovis* CEPA donneta.

Para optimizar la técnica de la PCR se tomó como control positivo a la cepa de *M. bovis* cepa donneta y como un control negativo se utilizó una cepa de *Mycoplasma* spp. del grupo *mycoides*. Los micoplasmas se hicieron crecer como se indica en el protocolo Tully *et al.*, 1986., que menciona lo siguiente:

En 2 ml. de medio líquido Hayflick (Jasper, 1981) se sembraron 200 µl de la cepa, *Mycoplasma bovis* cepa donetta, *Mycoplasma* del grupo *mycoides*, cepas de *Mycoplasma* spp aisladas de muestras de leche de tanque, se incubaron⁹ en aerobiosis a 37°C por 24 a 72 horas, al observar cambio de pH y/o turbidez se sembraron 20 µl, en placas de medio sólido Hayflick, y se incubaron en microaerobiosis a 37 °C con el 80-85 % humedad durante 48 horas para permitir el desarrollo de colonias con morfología típica de huevo frito, que se observaron con la ayuda del microscopio estereoscópico¹⁰. A partir de una colonia purificada se elaboró la concentración de cada uno de los micoplasmas, metodología descrita por Tully *et al.* 1983; utilizando una solución buffer de fosfatos (PBS) pH¹¹ 7.2.

4.6 LAVADO DE *Mycoplasma* spp.

De la obtención del concentrado de micoplasmas se tomaron 100 ml y se lavaron por 3 ocasiones de la siguiente manera:

Primero se centrifugó¹² a 11,300 xg durante 45 minutos y se eliminó el sobrenadante que son los restos del medio de cultivo, posteriormente la pastilla

⁹ Incubadora FORMA SCIENTIFIC

¹⁰ Microscopio estereoscópico ZEISS

¹¹ Potenciómetro COLE-PARMER

¹² Ultracentrifuga refrigerada BECKMAN

obtenida fue resuspendida con una solución buffer de fosfatos (PBS) pH¹³ 7.2, después fue procesada nuevamente en la centrifuga¹¹ a 11,300 xg durante 45 minutos, este paso se repitió por tres ocasiones más para lavar la pastilla y al final fue resuspendida en 1 ml. de PBS para ser almacenada a -20 °C. Este proceso se realizó para obtener 1 ml de *Mycoplasma bovis* concentrado, al igual que las cepas aisladas de las muestras de leche de tanque.

4.7 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *M. bovis* POR LA TÉCNICA DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.

4.7.1 EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción de ADN se realizó de todas las cepas de *Mycoplasma* spp. se utilizó para cada una de las cepas el protocolo de extracción de ADN con el método de tiocianato de guanidina como se indica a continuación:

- 1.- Se tomaron 500 µl de la cepa de micoplasma concentrada y se centrifugó¹⁴ 12 000 xg por 10 minutos posteriormente se decantó el sobrenadante.
- 2.- Se le agregó la solución de lisis I. con Tiocianato de Guanidina, (Apéndice III) y se homogenizó la pastilla en el vortex¹⁵ durante 5 minutos al final se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- 3.- Se agregó solución II. Con Acetato de amonio 7.4 M, (Apéndice III) que inactivó a las endonucleasas que fueron liberadas al romperse la membrana de la célula. Se Invertió 5 a 6 veces e incubando durante 10 minutos en hielo temperatura a la que actúa mejor el acetato de amonio.

¹³ Potenciómetro COLE-PARMER

¹⁴ Microcentrifuga BIOFUGE

¹⁵ Vortex LABNET

4.- Posteriormente se agregó la solución **III**. (Apéndice III) Que contiene cloroformo alcohol-isoamilico, se homogenizó con el vortex por 5 minutos y se centrifugó durante 15 minutos a 12 000 xg, con lo que se observaron tres zonas perfectamente delimitadas, de la primera fase de la cual se obtuvieron los ácidos nucleicos que se quedaron en una fase acuosa ubicada en la parte superior, la segunda que fueron restos celulares y la tercera donde se encuentran los materiales orgánicos de las soluciones antes utilizadas.

Se tomó con mucho cuidado la parte acuosa y se depositó en un tubo de 1.5 ml y se agregó nuevamente cloroformo alcohol-isoamilico para repetir el paso numero 4, esto se realizó con el fin de eliminar los restos celulares y de sales residuales.

5.- El sobrenadante se tomó y se le agregó solución **IV** (etanol absoluto) para precipitar el ADN, que se homogenizó con el vortex 5 minutos y se centrifugó a 12 000 xg por 15 minutos.

6.- Posteriormente se tomó el precipitado de ADN y se agregó solución **V** (Etanol al 70%) para purificar el ADN, se homogenizó con el vortex 5 minutos y se centrifugó por 15 minutos 12 000 xg, este paso se repitió 3 veces para purificar el ADN.

7.- Al concluir se dejó secar a temperatura ambiente por 12 horas aproximadamente.

8.- Finalmente se resuspendió la pastilla de ADN con 50 µl de agua bidestilada estéril y se almacenó a 4°C hasta su uso.

4.7.2 REACTIVOS PARA LAS REACCIONES DE LA PCR

INICIADORES

Se utilizaron los iniciadores de la secuencia del gen que codifica para la Proteína Oligo-peptido permeasa que identifica a *Mycoplasma bovis*, secuencia homologa de las oppD y oppF, con acceso en el Gen-Bank AF130119.

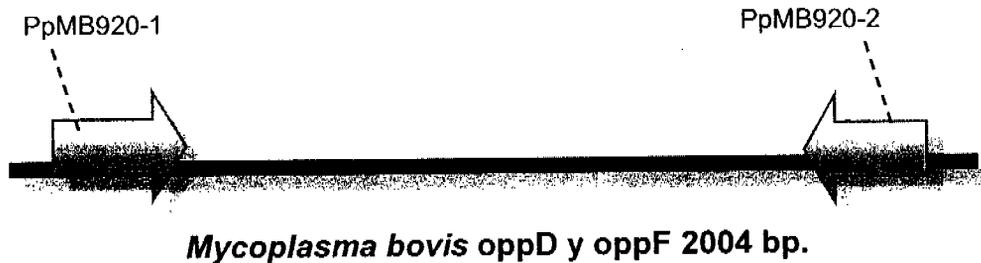


Fig. 2. Secuencia de OppD y OppF

1	AAGCTTCAGT	TTTAGCTCTT	TTTGAACAAA	TACGTCAAGA	GTACAATATA	TCAATAATTT
	TTCGAAGTCA	AAATCGAGAA	AAACTTGTTT	ATGCAGTTCT	CATGTTATAT	AGTTATTAAA
61	TAATTTTCGCA	TAACATTAGT	GTTGTCGCTA	AGTTTTGTGA	ATATATTTTAT	GTTATGTATG
	ATTAAAGCGT	ATTGTAATCA	CAACAGCGAT	TCAAAACACA	TATATAAATA	CAATACATAC
121	CTGGCAAAAT	TGTTGAAAGA	GGAAC TAGAA	AAGATATTTT	TACTAATCCA	GCTCACCCCTT
	GTCCGTTTTA	ACAAC TTTCT	CCTTGATCTT	TTCTATAAAA	ATGATTAGGT	CGAGTGGGAA
181	ATACATGAGC	GCTTATCTCG	GCTATACCTG	AAAATGATGA	TGAGAGATTA	TTCTCAATTC
	TATGTACTCG	CGAATAGAGC	CGATATGGAG	TTTTACTACT	ACTCTCTAAT	AAGAGTTAAG
241	AAGGAACCCC	ACCAGATATG	GCAAAC TTAC	CTATCGGTGA	CCCTTTTGCA	CCTAGAAATG
	TTCCCTGGGG	TGGTCTATAC	CGTTTGAATG	GATAGCCACT	GGGAAAACGT	GGATCTTTAC
301	ACTTTGCCTT	AGAAATGAC	TATGAAAAAG	AACCACCATT	AATTGAAATT	AATAGTCATC
361	ATAAAGCAGC	AACGTGACTA	CTTCACCCTG	ATGCACCAAA	AATACAAAGA	CCAAAAGAAT
421	TAGAACATAG	ACTAAAAAGT	TTTAGAAAGG	TATTTAAAGA	CGATGAAGAA	TAACGACAAT
	ATCTTGTATC	TCATTTTTCA	AAATCTTTCC	ATAAATTTCT	GCTACTTCTT	ATTGCTGTTA
481	AAAAAAGTCA	TTTTAGAAAT	TCAAGATCTT	AAAAAGTACT	TTTTAAATAA	CGGTAAGGTC
	TTTTTTCAGT	AAAATCTTTA	AGTTCTAGAA	TTTTTCATGA	AAAATTTATT	GCCATTCACG
541	AACAAAGCTG	TTGATGGTGT	GTCATTTAAA	TTACATGAAG	GTGAAATAGT	CGGTCTAATT
	TTGTTTCGAC	AACTACCACA	CAGTAAATTT	AATGTACTTC	CACTTTATCA	GCCAGATTAA
601	GGTGAGTCAG	GAAGTGGAAA	AACCAC TGT	GGACGTTCAA	TTCTAAGGCT	TTATGACGAT
	CCACTCAGTC	CTTCACCTTT	TTGGTGACAA	CCTGCAAGTT	AAGATTCCGA	AATACTGCTA
661	TTTAATGGTT	TTGTTACTTT	AGATGATCAA	ATCATTAGCG	GAGAAAGCAT	TTCTAAAAAA
	AAATFACCAA	AACAATGAAA	TCTACTAGTT	TAGTAATCGC	CTCTTTTCGTA	AAGATTTTTT
721	CGCGAAAAGT	TTTTGCGTAA	AAGAGTGCAA	ATGATCTTTC	AAGATCCACA	CGCGTCTTTA
	GCGCTTTTCA	AAAACGCATT	TTCTCACGTT	TACTAGAAAAG	TTCTAGGTGT	GCGCAGAAAT

781 AACGGCCAAA AAACATATCTA TAGCATTCTT AAAGAACCTT TAGTTGTCAA TAACATAATF
 TTGCCGGFTT TTTGATAGAT ATCGTAAGAA TTTCTTGAA ATCAACAGTT ATTGTATTAA

841 AAGCAAAAAA CTGATGATCT ATTTAGTGAC TGAAAAAAG TFACTGAGAA CTTTCAATTT
 TTCGTTTTTT GACTACTAGA TAAATCACTG ACTTTTTTTC AATGACTCTT GAAAGTTAAA

901 ACATTTTTTGC TTTATGCTAA AAAGTTAAAA ATTAAAAACC TTAAGGCAAT TAATGAGCCA
 TGTA AAAACG AAATACGATT TTTCAATTTT TAATTTTTGG AATTCGTTA ATTACTCGGT

961 TCTAGCACAT TTTTTCTTAA ATGATCAGAT AGACTAATTG ACTTTAAGTT TACTGCGAA
 AGATCGTGTA AAAAAGGATT TACTAGTCTA TCTGATTAAC TGAAATTCAA ACTGACCTT

1021 AACTTATCTA TTGATGAAAA TTTTGTCTTCT TATTTTAACT ACTTAGAAGA AAAACAAACA
 TTGAATAGAT AACTACTTTT AAAACAAAGA ATAAAAATTGA TGAATCTTCT TTTTGTTTGT

1081 ATGGAAAGCT CAATTATTAA TGAGATGTAC TCAAACACAG ATCAATTAAT GGCTTTCTAT
 TACCTTTCGA GTTAATAATT ACTCTACATG AGTTTGTGTC TAGTTAATTA CCGAAAGATA

1141 TACGAAAAGC AAGCGCAGTT TAGAAATAAT GATGTCACCT TTGACGAATT AGACTATATA
 ATGCTTTTCG TTCGCGTCAA ATCTTTATTA CTACAGTGAA AACTCGTTAA TCTGATATAT

1201 AATGCTACAA AGGAACFAGA ATTAACFATA AAATTATGTA AGTATTCACA AAAGCAATAT
 TTACGATGTT TCCTTGATCT TAATTGATTT TTTAATACAT TCATAAGTGT TTTTCGTTATA

1261 GATGCATTA ACAAATTAAG TGAATTAGAC AAAGAATTGA AAGAGTTAAA AAGTAATCAA
 CTACGTAATT TGTTTTAATTC ACTTAATCTG TTTCTTAACT TTCTCAATTT TTCATTAGTT

1321 AATGATTATT TATTAACFATA CAAAACGCT TTTAATAATT TTCTTTCGGA ATATAAGAAC
 TTACTAATAA ATAATTGATT GTTTTTGCGA AAATTATTAA AAGAAAGCCT TATATTCCTG

1381 GAGATCAAAA TTTGCCGTTA TGCAAGATTA AACTACTACG ACATAGATTT TACTTTTTTT
 CTCTAGTTTT AAACGGCAAT ACGTTCTAAT TTATGAATGC TGTATCTAAA AATGAAAAAA

1441 AACTATAAAA AAGAGCTAAC CAACAAAATA AGGTTAGATG TAATCAAAA ATATAAGTCT
 TTGATATTTT TTCTCGATTG GTTCTTTTAT TCCAATCTAC ATTAGTTTTT TATATTCAGA

1501 AAGTTAAGTT ATTTATCAAT AGATCAAAAT CGTAAATTTA TTGCTGAATT AAACAAATAT
 TTCAATTCOA TAAATAGTTA TCTAGTTTAA GCATTTAAAT AACGACTTAA TTTGTTTATA

1561 ACTAATAGTT TTTACATTGA AACTTAGAAA TCACTCCCAA TTTCTAAAGA CTTTAAAGCA
 TGATTATCAA AAATGTAAT TGTGAATCTT AGTGAGGGTT AAAGATTTCT GAAATTTCTG

1621 GTTGCTAAGT TAATAATTGA ATCTGATTAT AACTTTGATG TTAATGAATA TCTAAAGTTA
 CAACGATFCA ATTATTAAT TAGACTAATA TTGAAACTAC AATTACTTAT AGATTTCAAT

1681 AACCATTCTA ATGAATTAGA ATTTAATTCA GCACTTAGGA ATATTGAAGA TTCAATCAAG
 TTGGTAAGAT TACTTAATCT TAAATTAAGT CGTGAATCCT TATAACTTCT AAGTTACTTG

1741 GCTCAAAAAG AAATATTCTA TTCAAAAAGAT GAAAAACCAG CTTTGGCAA GAAAGAATTA
 CGAGTTTTCC TTTAATAAGT AAGTTTTCTA CTTTTGGTC GAAAACCGTT CTTTCTTAAAT

1801 GAAGCTGCTG AGCAAAAATT GGCTAATGCT GAGAAAGTTT TCAAAGCTGA AAACGATAAA
 CTTTCGACGAC TCGTTTTTAA CCGATTACGA CTCTTTCAA AGTTTCGACT TTTGCTATTT

1861 TATAACAAAA ATATTCAAAA TCAAATTAAG CAATTAGACA AAGACATTTCT TAATGAGAGC
 ATATTGTTTT TATAAGTTTT AGTTAATTC GTTAATCTGT TTCTGTAAGA ATTACTCTCG

1921 CTTTTATATA AAAATTTAAA AACTCAGCAA GGTATTAATG ATCTCAAGTT TAAAAAGATT
 GAAAATATAT TTTTAAATTT TTGAGTCGTT CCATAATTAC TAGAGTTCAA ATTTTTCTAA

1981 AATGAAGCGT TTTTTGAAAA GCTT
 TTACTTCGCA AAAAATTTT CGAA

MobOPPD-FORWAR Posición (10-21)

MobOPPD-REVERSE Posición (1921-1903)

Fig. 2 Secuencia del gen que corresponde a la permeasa OppD/F. Se muestra la identificación de los oligonucleótidos MobOppD-F en amarillo y los oligonucleótidos de MobOppF-R en naranja.

Tabla 6. Secuencia de iniciadores para el gen que codifica la Permeasa

Iniciadores	Dirección	Secuencia	Concentración Inicial
PPMB920-1	5'-3'	GGCTCTCATTAAGAATGT C	195.39 Pmol
PPMB920-2	5'-3'	TTTTAGCTCTTTTTGAACAAAT	266.66 Pmol

El Buffer¹⁶ para las reacciones se utilizó en una concentración de 10 X

El Cloruro de Magnesio¹⁵ (MgCl₂), se utilizó a una concentración de 25 mM, la TAQ polimerasa¹⁵ se utilizó en una concentración de 1.9 UI (Unidades Internacionales), los DNTP'S, se utilizaron en una concentración de 200 MM de cada uno. El marcador de peso molecular que se utilizó fue el 1 Kb DNA Ladder¹⁷ para verificar el tamaño del producto.

4.7.3 OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

Una vez que se obtuvo el concentrado de *Mycoplasma bovis* cepa donneta se realizó la optimización de las condiciones de PCR, utilizando el protocolo de Hotzel 1999 y se utilizó como control negativo a la cepa de *Mycoplasma* spp. del grupo *mycoides*.

¹⁶ ALTA ENZYMES

¹⁷ INVITROGEN

Debido a que no se obtuvo una amplificación se modificaron las cantidades de reactivos y las condiciones mostradas por Hotzel 1999. Las reacciones utilizadas fueron de un volumen total de 25 μ l cada una, para optimizar la reacción se utilizaron 3 reacciones una con la cepa de *Mycoplasma bovis* cepa donneta, otra *Mycoplasma* del grupo *mycoides* y la otra como control de los reactivos y/o contaminación sin template de ADN en su lugar se agregó agua bidestilada estéril.

Tabla 8. Reacciones para la PCR

Reactivos	1 reacción	3 reacciones
DNTP'S	1 μ l	3 μ l
PPMB920-1	1 μ l	3 μ l
PPMB920-2	1 μ l	3 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	3.5 μ l	10.5 μ l
Buffer 10 X	2.5 μ l	7.5 μ l
DNA	5 μ l	15 μ l
H ₂ O	10.75 μ l	32.25 μ l
TAQ (5 UI)	0.25 μ l	0.75 μ l
TOTAL	25 μl	75 μl

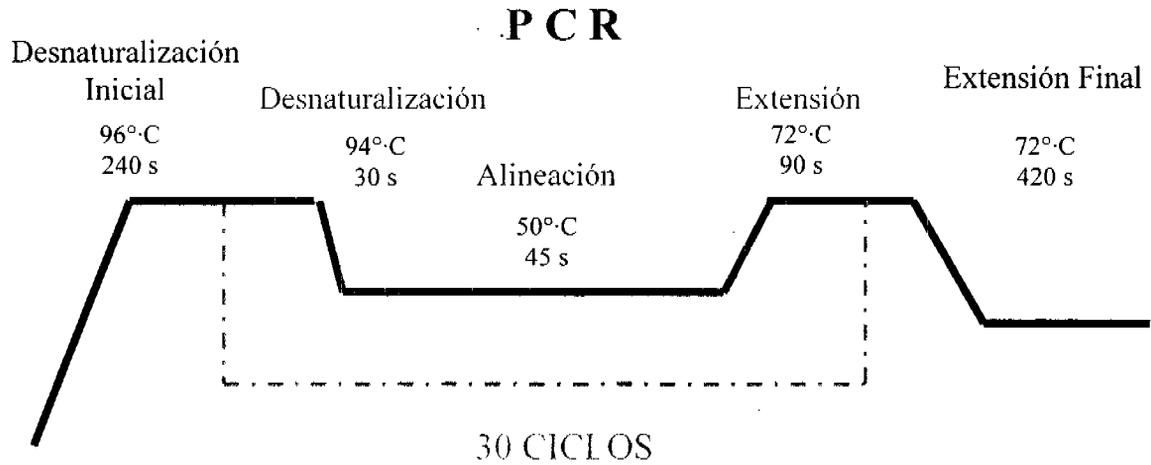


Tabla 9. Condiciones de temperaturas para la PCR

ETAPA	T°	TIEMPO
Desnaturalización Inicial	96°C	240 s
Desnaturalización	94°C	30 s
Alineación	50°C	45 s
Extensión	72°C	90 s
Extensión Final	72°C	420 s

4.7.4 VISUALIZACION DE GEL

Para visualizar el producto de la PCR se realizo un gel de agarosa¹⁸ al 1% en 50 ml de TAE 1X con 5 µl de bromuro de etidio. Se cargaron las muestras junto con la solución de carga teñida con 0,2 % de Azul de Bromofenol y 0,2% de Cianol de Xyleno.

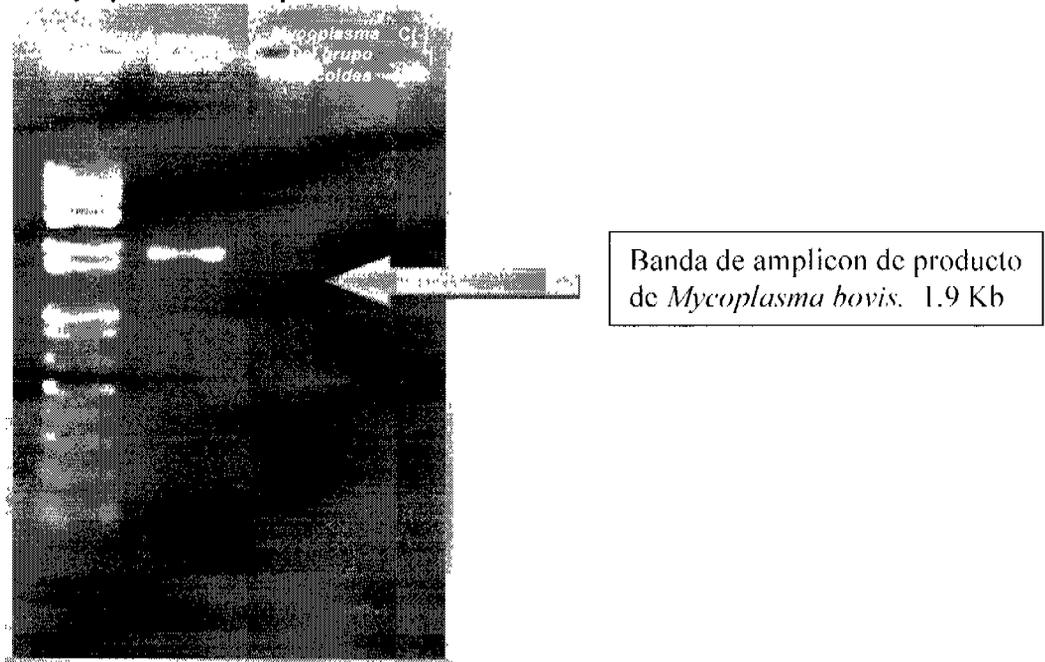
En el pozo 1 se depositaron el 3 µl del marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Figura 3) en el pozo 2 se colocaron 5 µl de *Mycoplasma bovis* cepa donnetá, en el pozo 3 se colocaron 5 µl de *Mycoplasma* spp. Por ultimo en el pozo 4 se depositó la reacción sin ADN como control negativo.

¹⁸ LAB. AGAROSA

Material y métodos

La muestra se corrió por electroforesis con un buffer de corrida en una solución de TAE 1 X a 80V por 45 minutos. Posteriormente el gel se observó en el transiluminador, donde se visualizó el marcador de peso molecular en el pozo 1 y en el pozo dos el amplicon de 1.9 Kb, en el pozo 4 y 5 (controles negativos) no se observó amplificación alguna (Fig 4).

Figura 4. Producto de PCR *Mycoplasma bovis* cepa donneta en transiluminador con luz Ultravioleta.



Después de observar el transiluminador se llevo el gel al fotodocumentador ¹⁹ para tomar la imagen.

En ambas imágenes la cepa de *Mycoplasma bovis* cepa donneta amplificó con los iniciadores en al reacción de PCR, la cepa de *Mycoplasma* spp. del grupo *mycoides* no amplificó al igual que con el control negativo sin ADN.

¹⁹ KODAK

4.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de las pruebas utilizadas en este trabajo se analizaron con el programa Análisis epidemiológico de datos tabulados EPIDAT 3.1²⁰ para evaluar los resultados con el índice de concordancia entre las dos metodologías utilizadas (pruebas bioquímicas y la PCR) calculando el valor de Kappa de Cohen según el cuadro de Landis y Koch. Tabla 10

Tabla 10. Cuadro Landis y Koch.

Kappa	Grado de acuerdo
< 0	Sin acuerdo
0-0,2	Insignificante
0,2-0,4	Bajo
0,4-0,6	Moderado
0,6-0,8	Bueno
0,8-1	Muy bueno

²⁰ Programa EPIDAT 3.1 Organización panamericana de la salud.

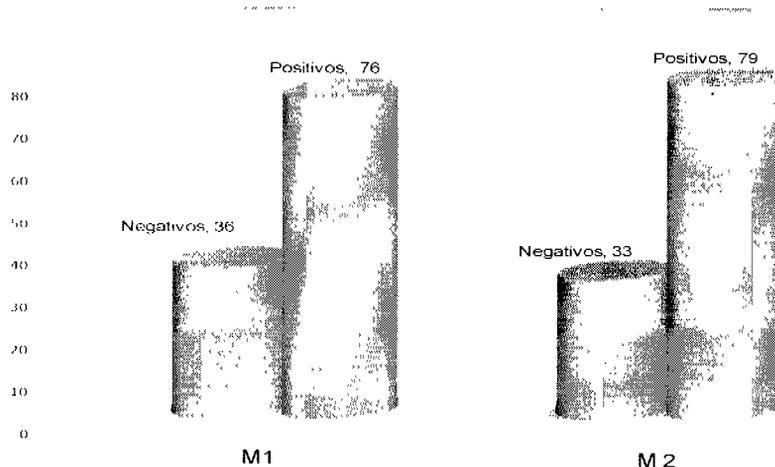
V. RESULTADOS

5.1 RESULTADOS GLOBALES EN LOS HATOS MUESTRADOS DE LECHE DE TANQUE DE ALMACENAMIENTO.

Un hato se consideró como positivo cuando se detectó en uno de los dos muestreos la presencia de micoplasmas. De los 112 hatos muestreados la prevalencia de *Mollicutes* fue de 84 (75 %) hatos y 28 (25 %) hatos resultaron negativos al aislamiento. Los hatos que resultaron positivos al género *Acholeplasma* spp se consideraron hatos negativos a micoplasma con lo que se determino la frecuencia de *Mycoplasma* spp. en los hatos en estudio que fue del 62 % (69).

El porcentaje observado de *Mycoplasma* spp. para cada uno de los muestreos fue el siguiente, en el muestreo 1 (M1) (32 %) hatos positivos y en el muestreo 2 (M2) (30 %) hatos (Grafico 3).

Grafico 3. Porcentajes de *Mycoplasma* spp. en los diferentes muestreos 1 (M1) y 2 (M2).



Resultados

De los 69 hatos considerados como positivos, 20 (18 %) de ellos resultaron positivos en ambos muestreos y los 49 (44%) restantes fueron positivos a uno solo de los muestreos (Tabla 11).

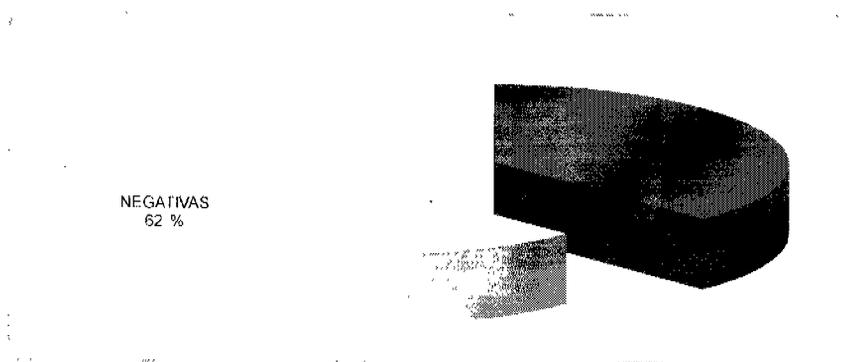
Tabla 11. Porcentajes de hatos positivos a micoplasmas.

AISLAMIENTOS EN HATOS DE <i>Mycoplasma</i> spp.	HATOS	%
Positivos a un solo muestreo	49	44 %
Positivos en ambos muestreos	20	18%
Total de hatos positivos	69	62%
Negativos	43	38%
Hatos totales	112	

5.2 RESULTADOS GLOBALES DE LAS MUESTRAS DE LECHE DE TANQUE DE ALMACENAMIENTO.

Las 224 muestras de leche de tanque analizadas en los dos muestreos arrojaron el siguiente resultado: las muestras de leche positivas a *Mollicutes* fueron 84 (38 %) y 140 (62%) negativas (Grafico 4).

Grafico 4.- Muestras positivas al aislamiento de *Mycoplasma* spp.



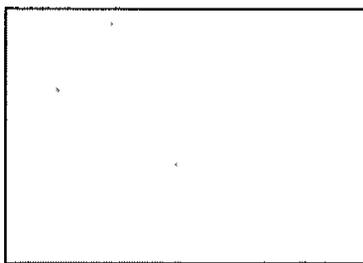
Se observó que en solo dos muestras positivas se presentó el aislamiento de más de una colonia, las cuales mostraron morfología diferente, una de ellas presento 2 tipos de colonia y la otra presento 3 tipos de morfología, por lo que obtuvieron un total de 87 aislados de micoplasmas.

5.2.1 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS ESPECIES DE MICOPLASMAS AISLADAS EN LECHE DE TANQUE DE ALMACENAMIENTO

5.2.1.1. Identificación de género

El 100 % de los aislados presentaron morfología típica de micoplasmas (Figura 1), fueron filtrables a 0.45 μm , asimismo, en la prueba de sensibilidad a la digitonina 72 (82 %) cepas se identificaron como *Mycoplasma* spp. y el resto como *Acholeplasma* spp. (Figuras 2 y 3)

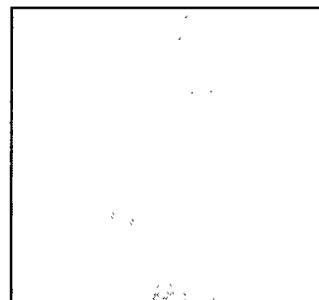
Figura 1. Morfología de Micoplasma



2. Sensibilidad a la digitonina de Micoplasma.



3. Género *Acholeplasma* spp.



5.2.1.2 Identificación bioquímica de especie

Para la identificación de especie de los aislados se realizaron las pruebas siguientes, fermentación de la glucosa y manosa, hidrólisis de la arginina y de la caseína, además de la reducción del tetrazolio. Como se muestra en la tabla 12 los resultados de las pruebas nos dieron a conocer 4 de las especies con mayor importancia a nivel de micoplasmas asociados a problemas de mastitis, *Mycoplasma bovis*, *M. californicum*, *M. canadense* y *M. alkalescens*, conjuntamente, un grupo de cepas de micoplasmas aisladas no fue posible su identificación con las pruebas realizadas, ya que se presentaban resultados variables, es así que se determinó ubicar estas cepas como *Mycoplasma spp.*

Tabla 12. Resultados de la pruebas bioquímicas realizadas a los aislados para la identificación.

ESPECIE	PRUEBAS POSITIVAS	PRUEBAS NEGATIVAS
<i>M. bovis</i>	Reducción del tetrazolio aerobio y anaerobio.	Fermentación de la glucosa, manosa, y la hidrólisis de la arginina, caseína
<i>M. canadense</i>	Fermentación de la manosa, reducción del tetrazolio	Fermentación de la glucosa, hidrólisis de la arginina y caseína
<i>M. californicum</i>		Fermentación de la glucosa, manosa, hidrólisis de la arginina, caseína y reducción del tetrazolio aerobio y anaerobio
<i>M. alkalescens</i>	Hidrólisis de la arginina	Fermentación de la glucosa, manosa, hidrólisis de la caseína y reducción del tetrazolio aerobio y anaerobio
<i>Mycoplasma spp</i>	Variable	Variable

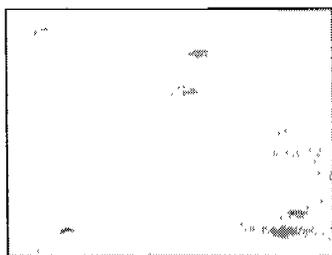


Fig. 4 Morfología típica de *Mycoplasma*

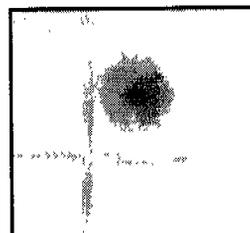


Fig. 5 Tetrazolio positivo de *Mycoplasma bovis*

Mycoplasma bovis



Fig. 5 Tetrazolio positivo líquido de *Mycoplasma bovis*

Mycoplasma canadense



Fig. 6 Tetrazolio positivo de *Mycoplasma canadense*



Fig. 7 Manosa positiva *Mycoplasma canadense*

Mycoplasma spp.

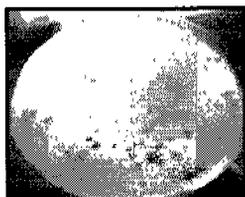


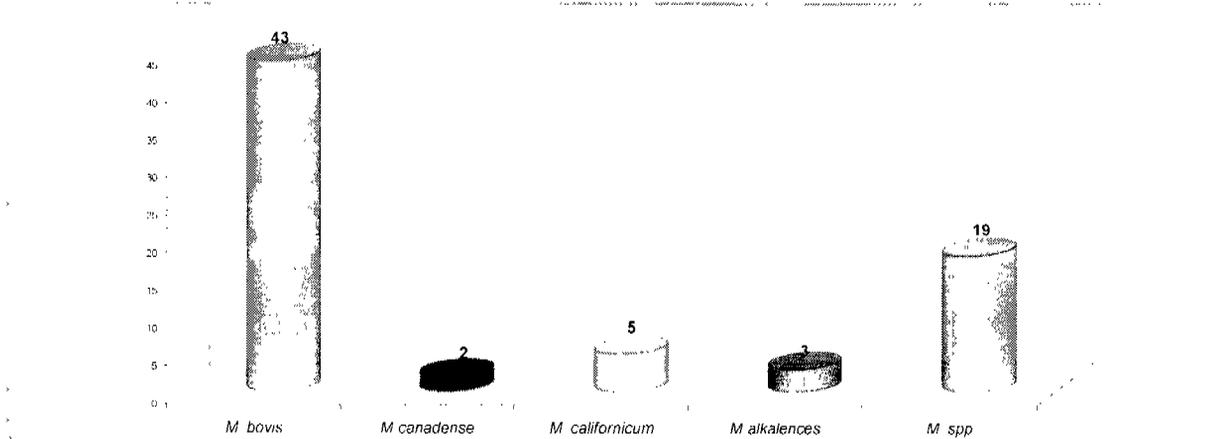
Fig. 8 Caseína positiva *Mycoplasma* spp.

Con la interpretación de las reacciones de las pruebas bioquímicas realizadas, de las 72 cepas de *Mycoplasma* spp, se identificaron, 43 (60 %) especies identificadas como *Mycoplasma bovis* 5 (7%), fueron identificadas como

Resultados

Mycoplasma californicum 3 (4%), *Mycoplasma alkalescens* 2(3%), *Mycoplasma canadense* y por ultimo 19 (26%) *Mycoplasma* spp. (Grafico 7).

Grafico 7. Especies aisladas en los 87 aislados de muestras de leche de tanque.



5.2.2 ESPECIES DE MICOPLASMAS AISLADAS EN MUESTREO 1 Y 2 DE LECHE DE TANQUE DE ALMACENAMIENTO

En el grafico 8 se puede observar los aislados en los diferentes muestreos mostrando un comportamiento similar entre cada uno.

Grafico. 8 Especies de micoplasmas identificadas en Muestreo 1 y 2.

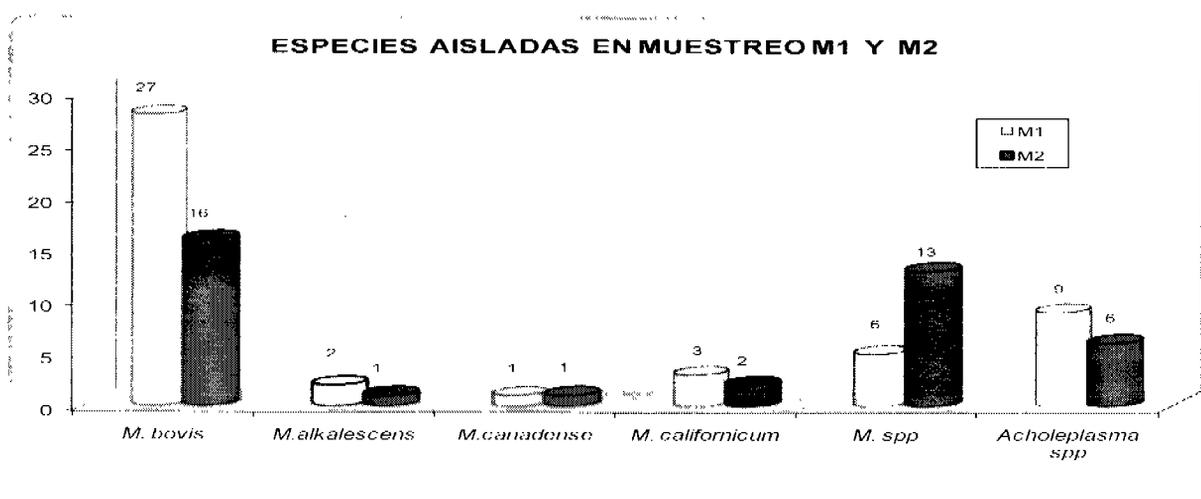


Tabla 13. Identificación bioquímica con los resultados de las cepas involucradas en el estudio.

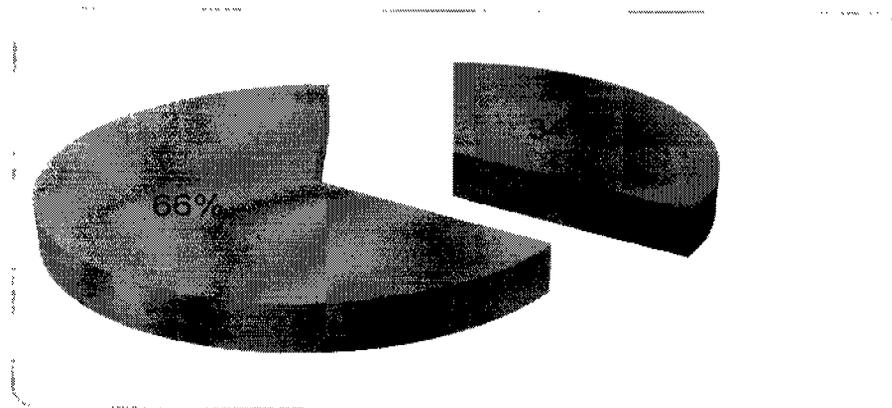
D	G	M	A	T	C	Identificación Bioquímica
-	-	-	-	+/+	-	<i>M. bovis</i>
+	-	-	-	-/-	-	<i>M. californicum</i>
+	-	-	+	-/-	-	<i>M. alkalecens</i>
+	-	+	-	+/+	-	<i>M. canadense</i>
+	-	+		-/-	-	<i>M. spp</i>
+	+v	+v	-v	+v/+v	-v	<i>M. spp</i>

D: Digitonina
 G: Glucosa
 A: Arginina
 M: Manosa
 C: Caseína
 T: Tetrazolio
 V: Variable

5.2.3 RESULTADOS DE HATOS POSITIVOS AL AISLAMIENTO DE *M. bovis*

De los 112 hatos muestreados con una población aproximada de 241 bovinos en producción solo 38 (34 %) hatos resultaron positivos al aislamiento e identificación bioquímica de *Mycoplasma bovis* y 74 (66 %) fueron negativos.

Grafico 9. Hatos positivos a *Mycoplasma bovis*

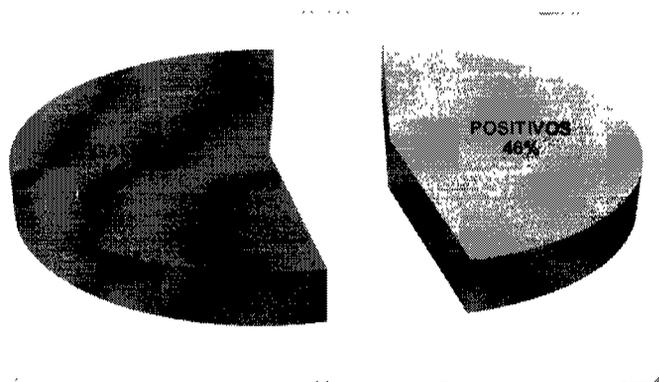


5.3 RESULTADOS GLOBALES EN LOS HATOS MUESTRADOS DE LECHE DE TANQUE DE ALMACENAMIENTO POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La técnica de la PCR, arrojó los siguientes datos. Del total de las 87 cepas aisladas se obtuvo que 33 fueron identificadas como *M. bovis*, y las 54 restantes fueron negativas.

De las especies identificadas bioquímicamente como *Acholeplasma* spp, también resultaron negativas por medio de la PCR. Así que del total de 72 cepas de *Mycoplasma* spp. por medio de la PCR se obtuvo una prevalencia de 46 % (33) de *Mycoplasma bovis*.

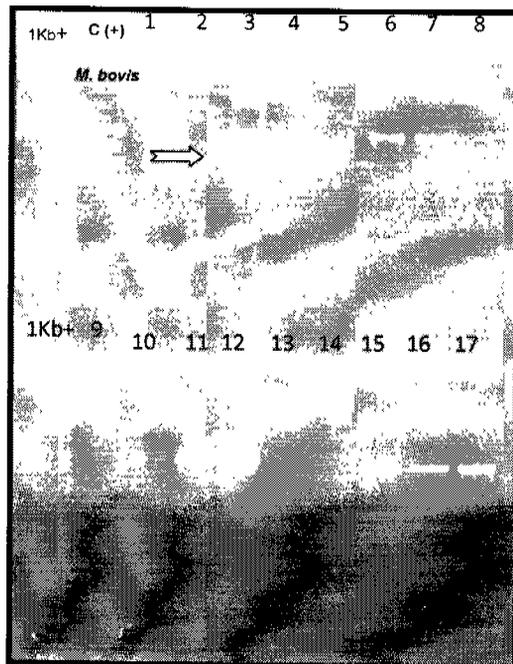
Grafico 10 Cepas identificadas como *M. bovis* por la PCR.



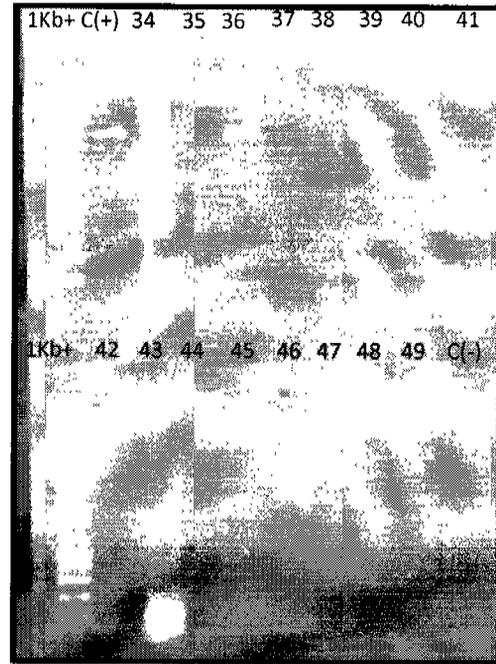
Para el primer muestreo (M1) 22 hatos resultaron positivos, al observar el producto del amplicon correspondiente a 1.9 Kb en los geles de agarosa al 1% de la reacción de PCR, con secuencia que codifica para el gen de la permeasa OPPD y OPPF. De *Mycoplasma bovis*, y para el segundo muestreo (M2) solo 11 hatos resultaron positivos al ser identificados al observarse el producto del amplicon.

Reacciones de PCR de los 87 aislados

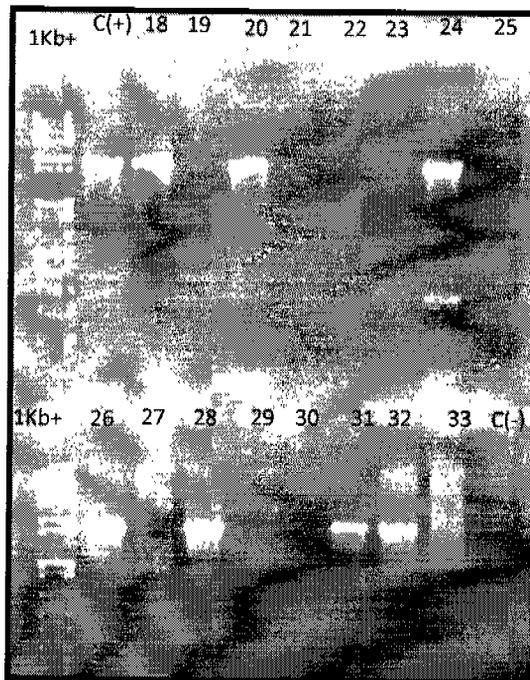
1 Identificación de cepas 1 a 17 por PCR para *M. bovis*



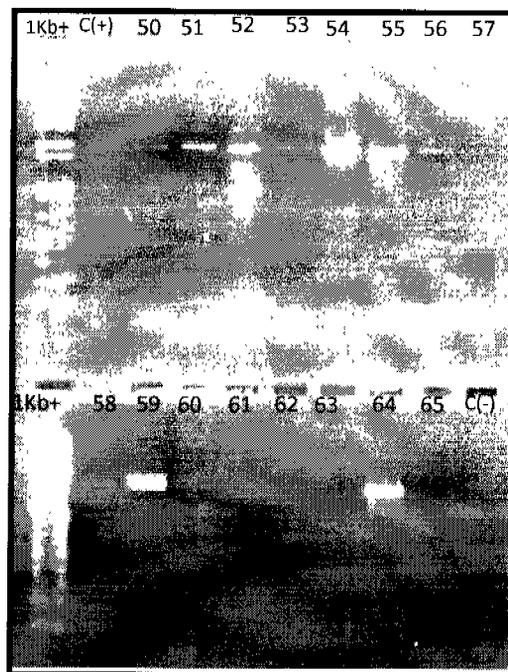
3 Identificación de cepas 34 a 49 por PCR para *M. bovis*.



2 Identificación de cepas 18 a 33 por PCR para *M. bovis*



4 Identificación de cepas 50 a 65 por PCR para *M. bovis*.



Las pruebas bioquímicas expusieron la identificación de 43 aislados como *M. bovis* mientras que la técnica de la PCR, mostró a 33 aislados. 30 cepas fueron identificadas por ambas metodologías como *M. bovis*, las 10 cepas restantes que bioquímicamente fueron identificadas como *M. bovis* para la PCR resultaron negativas. Tres de las cepas aisladas como *M. bovis* cuando bioquímicamente fueron identificadas como *M. canadense*, *M. alkalescens* y *Mycoplasma* spp.

5.5 ANALISIS ESTADISTICO.

DETERMINACION DEL ÍNDICE DE CONCORDANCIA PRUEBAS REALIZADAS.

Para examinar la concordancia de los resultados de las metodologías utilizadas se desarrolló un cuadro de 2 x 2 para obtener el valor de Kappa de Cohen con dos observadores (Resultados de ambas metodologías) con el programa de EPIDAT 3.1 (Tabla 14).

Tabla 14 .Determinación de los resultados de pruebas bioquímicas y PCR.

		P C R		TOTAL
		(+)	(-)	
BIOQUIMICAS	(+)	30	13	43
	(-)	3	41	44
TOTAL		33	54	87

Tabla 15 .Determinación Los resultados arrojados fueron los siguientes

Nivel de confianza del índice de concordancia	95 %
Valor de Kappa de Cohen	0,6312

VI. DISCUSION

6.1 IDENTIFICACIÓN DE *Mycoplasma* spp.

Se logró el aislamiento de bacterias de la Clase Mollicutes en la leche de tanque de almacenamiento en 84/112 (75%) hatos lecheros. De los cuales, con la prueba de la digitonina, se observó 69 (62%) hatos positivos a *Mycoplasma* spp. y 15 (13%) positivos a *Acholeplasma* spp., este ultimo microorganismo está considerado como apatógeno y contaminante del medio ambiente, en contraste el género *Mycoplasma* spp está considerado como patógeno de los animales domésticos, causante de mastitis y problemas respiratorios en los bovinos. Los resultados son similares al estudio realizado por Jasper 1981 en Norte América donde obtuvo un 64 % de muestras de leche de tanque positivas al aislamiento de *Mycoplasma* spp. Asimismo, Richard *et al.*, 2006 en Canadá obtuvieron un 74 % de aislados positivos a *Mycoplasma* spp. en leche de tanque. Se encontraron estudios realizados con leche directa de bovinos con problemas de mastitis clínica por Jasper en 1981 donde logró identificar a *Mycoplasma* spp en el 52 % de las muestras de leche analizadas y un 5% a *Acholeplasma laidlawii* y Miranda-Morales, reportó un 75% de *Mycoplasma* spp. en el estado de Hidalgo, México en el año de 1999.

6.2 TIPIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE ESPECIES DE *Mycoplasma* spp.

De las cepas de *Mycoplasma* spp (72) se identificaron bioquímicamente las siguientes especies, *Mycoplasma bovis* 43 (60%), *Mycoplasma californicum* (7%), *Mycoplasma alkalescens* (4%), *Mycoplasma canadense* (3%), porcentajes que coinciden con los resultados de Jasper 1981 que de 104 muestras de leche de

tanque de bovino identificó a *M. bovis* en un 57 %, a *M. alkalescens*, *M canadense* y *M. bovigenitalium* en un 5 % respectivamente. Así mismo Kirk *et al*, 1997 en EEUU detectó una frecuencia del 54% de *M. bovis*, en un 34 % a *M. californicum* y *M. bovigenitalium*, en muestras de leche de tanque de bovino. En contraste los estudios de Richard *et al.*, 2006 en Canadá reportaron el aislamiento de *M. bovis* en 1.6 % y de *M. alkalescens* en 1.9% de muestras de leche de tanque de almacenamiento.

En estudios que muestran el porcentaje de aislados de *Mycoplasma bovis* en muestras de leche directa de animales con problemas de mastitis encontramos que Kirk 1996 reportó un 50 % de aislados como *Mycoplasma bovis* de 600 animales, también González *et al.*, 1997 en España reportaron una prevalencia de *Mycoplasma bovis* de 3.1 % en muestras directas de leche de bovinos con problemas de mastitis. Ayling *et al.*, 2004 en Inglaterra identificaron por pruebas bioquímicas a 4 aislados de *Mycoplasma bovis* y 13 aislados de *Acholeplasma* spp de 251 muestras de leche de bovinos con problemas de mastitis. También Filioussis *et al.*, 2005 en Grecia con muestras de leche directa observaron un 5.4 % de aislados de *M. bovis*. Este microorganismo es más frecuentemente aislado como lo muestran los estudios realizados en Europa, América y hacen notar que la presencia de *Mycoplasma bovis* en Europa ha sido reportada con una baja frecuencia.

Frente a los porcentajes de las diferentes especies aisladas, tanto en este trabajo y otros ya mencionados evidencian que *Mycoplasma bovis* es la especie más frecuentemente aislada a partir de muestras de leche de tanque de

almacenamiento, no obstante *M. californicum* y *M. canadense* y algunas otras especies más, están consideradas también como responsables de mamitis micoplásmica bovina, por lo que el monitoreo en leche de tanque conlleva a tener un control sanitario como rutina en los establecimientos lecheros.

6.3 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR POR LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA DE CEPAS DE *Mycoplasma bovis*

Con la PCR se obtuvo que 33/72 (46%) de las cepas aisladas fueron identificadas como *Mycoplasma bovis* y el 54% restante fueron negativas de acuerdo al amplicon de 1.9 Kb de la secuencia que codifica para la permeasa OPPD/F 100 % específica de *Mycoplasma bovis*. Hotzel *et al.*, 1999 estandarizaron la técnica de la PCR para *M. bovis* con los iniciadores PPMB920-1 y PPMB920-2, técnica que Bashiruddin *et al.*, 2004, utilizaron para demostrar 100 % de especificidad, a diferencia de técnicas de otros autores como Dediu *et al.*, 1995, Johansson *et al.*, 1996, Subramaniam *et al.*, 1998, Hotzel and Sachse 1998 con diferentes secuencias de iniciadores. En contraste Hirose *et al.*, 2001 utilizaron la PCR con iniciadores diferentes que los de Hotzel donde identifico 7 % de animales positivos a *Mycoplasma bovis*.

Este trabajo mostró que por la PCR 33/87 aislados fueron positivos a *Mycoplasma bovis* mientras que las pruebas bioquímicas 43/87 fueron positivas, ambas pruebas realizadas coinciden en 30 de los 87 aislados.

Estudios realizados con anterioridad utilizaron la identificación bioquímica y molecular para *M. bovis* fueron los de Shane *et al.*, 1999 que realizaron aislamiento, identificación bioquímica y molecular por la PCR para *M. bovis* con

diferentes secuencias de iniciadores y trabajaron con muestras de tanque de leche además de leche directa de bovinos con problemas de mastitis, ellos trabajaron 445 muestras de leche de tanque, de las cuales 22 fueron positivas PCR, bioquímicamente 3 fueron positivas y 445 negativas, de las 1, 363 muestras de leche directa obtuvieron por PCR 101 positivos con y por bioquímicas 113 estos resultados muestran lo complicado de la interpretación de las pruebas bioquímicas de las especies de Micoplasmas. Igualmente Pinnow *et al.*, 2001 utilizó la metodología de Hotzel *et al.* 1999, donde localizaron a *M. bovis* en 26 de 53 muestras de leche de bovino con problemas de mastitis y realizaron el aislamiento e identificación bioquímica obteniendo el mismo resultado de positividad.

En este trabajo se obtuvo que 29/112 hatos fueron positivos a *Mycoplasma bovis* por medio de la PCR. Estudios relacionados como el de Fox *et al.*, 2005 reportaron la identificación de *M. bovis*, de muestras de leche de tanque en un 70 % de los hatos muestreados con la técnica de PCR de Hotzel 1996.

La diferencia que marca la PCR con la identificación bioquímica nos muestra que la técnica molecular nos reduce el número de muestras positivas. La interpretación bioquímica y molecular difirieron en resultados esto se puede deber a lo difícil que es la interpretación de algunas reacciones bioquímicas dentro del género de micoplasmas, lo que hace la prueba de PCR fundamental para la identificación de especies de micoplasmas.

Con el análisis de concordancia entre las pruebas realizadas (identificación bioquímica y molecular por la PCR) mediante el valor de Kappa, indico que el grado de acuerdo entre las dos pruebas es bueno con un valor de Kappa de 0,63.

Este trabajo permitió establecer que la prueba de la PCR es indicada para el diagnóstico de *M. bovis* de leche de tanque y nos reduce el tiempo de identificación. Además este trabajo conducirá a la realización de otro estudio para establecer la identidad de los aislados que no fue posible su tipificación por los dos métodos utilizados en esta investigación por lo que es necesario caracterizar las cepas de Micoplasmas aisladas de leche de tanque de bovino. Asimismo es preciso realizar un seguimiento individual de los animales de cada uno de los hatos infectados para promover medidas de control más eficaces contra la micoplasmosis en la zona. En México este es el primer reporte sobre el aislamiento e identificación bioquímica y molecular mediante la PCR de especies de micoplasmas aisladas en leche de tanque de almacenamiento.

VII. CONCLUSIONES

Primera: El porcentaje de aislados de *Mycoplasma* spp. en la leche de tanque de almacenamiento de los hatos en estudio fue del 62%.

Segunda: *Mycoplasma bovis* se identificó bioquímicamente en el 60 % de los aislados y en menor porcentaje *Mycoplasma californicum* 4%, *Mycoplasma alkalescens* 3%, *Mycoplasma canadense* 3% y especies no identificadas como *Mycoplasma* spp., 26 %.

Tercera: Con la PCR se logró la identificación del 46 % de los aislados como *Mycoplasma bovis*.

Cuarta: El valor obtenido de Kappa fue de 0,63 lo que indica un grado de concordancia **bueno** entre ambas metodologías.

REFERENCIAS.

1. SIAP (Servicio De información agroalimentaria y pesquera) de la SAGARPA (Secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural pesca y alimentación) 25 05 2007.
2. Secretaria de Agricultura Recursos Pesqueros y Alimentación. Boletín de la leche 2004. Servicio de información y estadística agroalimentaria y pesquera SAGARPA 2004:9-13.
3. Avila TS, Gutierrez CHAJ. Mastitis en ganado bovino. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. 2004.
4. Kirk J y Mellenberger R. La mastitis: Una visión general Illinois-Iowa Dairy Handbook, SUA-ED, FMVZ. UNAM. 1995.
5. Britten A, Getting The Jump On Mycoplasma Outbreaks. NMC Annual Meeting Proceedings 2006.
6. NMC Publication "Laboratory and Field Handbook on Bovine Mastitis" (1999) pg. 171.
7. Nicholas RAJ, Ayling RD. *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis, and control. Res Vet Sci 2003;74:105-112.
8. Crist WL, Harmon RJ, O'leary J, Mc Allister AJ. Mastitis and its control; Cooperative extension service. Estados Unidos; University of Kentucky Agriculture College NMC.1997;140:1-13.
9. Valdespino JRO. Pérdidas por desecho prematuro de vacas en un hato lechero en México. Campo Experimental Querétaro México. FAO – ONU.1984.

10. Soca-Perez M, Suárez YE, Rivero M, *et al.*, 2005 Comparación de la incidencia epizootiológica de la mastitis clínica en dos rebaños lecheros después del uso del agua para la antisepsia final del pezón. REDVET;3;11.
11. Nicholas RAJ, Ayling RD. Recent developments in the diagnosis and control of mycoplasma infections in cattle. 23 Congreso Mundial de Buiatria Quebec, Canadá. Del 11 al 16 de Julio 2004.
12. Jasper DE. Bovine Mycoplasmal mastitis. Adv Vet Sci Comp Med. 1981;25:121-157.
13. Miranda-Morales RE. Patogenicidad de Micoplasmas involucrados en la mastitis bovina (Tesis de Maestría). México (DF) México. Universidad Nacional Autónoma de México 1999:1-50.
14. Avila TS, Cano CP. Mastitis causada por *Mycoplasma*. Departamento de producción animal: Rumiantes. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. 2005.
15. Farshid S, Edward GC. *Mycoplasma bovis* - associated disease: new syndromes and emerging problems. Estados Unidos; University of Saskatchewan 2003;3:1-6.
16. Farnsworth RJ Microbiologic examination of bulk tank milk. Vet Clin North Am Food Anim Pract.1993;3:469-474.
17. Ollis GW, Shirley AR, Schoonderword M, Schipper C. Detection of *staphylococcus aureus* in bulk tank milk using modified Baird-Parker culture media Can Vet J 1995;36:619-624.

18. Tenk M. Examination of *Mycoplasma bovis* infection in cattle. Thesis Doctoral: Szent István University. Postgraduate School of Veterinary Science 2005.
19. Hale HH, Helmboldt W, Plastringe N, y Stula EF. Bovine mastitis caused by a *Mycoplasma* species. *Cornell vet* 1962;52:582-591.
20. Shane C, Carman J, Dinsmore P, Walker RL, Collins JK. Detection and identification of *Mycoplasma* from bovine mastitis infections using a nested polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 1999;11: 432-435.
21. Sache K, Helbig JH, Lysnyanshy LL, Grajetzki C, Müller W, Jacobs E, Yogev D. Epitope Mapping of Immunogenic and adhesive structures in repetitive domains of *Mycoplasma bovis* variable surface lipoproteins. *Infect Immun* 2000;2:680-687.
22. Hotzel H, Heller M, Sachse K. Enhancement of *Mycoplasma bovis* detection in milk samples by antigen capture prior to PCR. *Mol and Cell Probes* 1999;13:175-178.
23. Subramaniam S, Bergonier D, Poumarat F, Capaul S, Schlatter Y, Nicolet J, *et al.*, Species identification of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* based on the *uvrC* genes by PCR. *Mol and Cell Probes* 1998;12:161–169.
24. Bashiruddin JB, Frey J, Königsson HM, Johansson KE, Hotzel H, Diller R, *et al.* Evaluation of PCR systems for the identification and differentiation of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis*: a collaborative trial. *Vet J* 2005;169: 268-275.

25. Ávila TS, Domínguez J, Ruiz H, Valdivieso A, y de la Peña. Evaluación de un brote de mastitis por *Mycoplasma bovis* y otros agentes etiológicos en un hato productor de leche. Memorias del IX Congreso Nacional de Buiatria; 1983 agosto 16 al 18; Puebla (Puebla) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC, 1983:85-87.
26. Miranda-Morales RE, Chávez TR, Sánchez RM y Ruhnke L. Aislamiento y tipificación de micoplasmas involucrados en la mastitis bovina en Tizayuca, México. XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias; 1994 Octubre 9 al 15; Acapulco (Guerrero) México. Congreso Panamericano de ciencias veterinarias.
27. Hernández AL, Jaramillo ML. Comparación de pruebas serológicas para el diagnóstico de mastitis por *Mycoplasma bovis*. Vet Méx 1995;26:353-357.
28. Infante MF, Flores GGH y Lozoya CHJ. Identificación de *Mycoplasma* spp. En leche bovina con una prueba de inmunoperoxidasa. Vet Méx 2004;35:101-108.
29. Núñez DAC. Detección de mastitis bovina subclínica por micoplasmosis mediante diagnóstico serológico (prueba de ELISA indirecta) y aislamiento (Tesis de licenciatura) México (DF) México. Universidad Nacional Autónoma de México 2005:2-10.
30. The National Animal Health Monitoring System. The centers for Epidemiology and Animal Health, The U.S. Department of Agriculture. *Mycoplasma* in bulk tank milk on U.S. Dairies 2003;1-3.

31. Kirk JH, Glen K, Ruiz L, Smith E. Epidemiologic analysis of *Mycoplasma* spp isolated from bulk-tank milk samples obtained from dairy herds that were members of a milk cooperative JAVM 1997;8:1036-1038.
32. Filioussis G, Christodoulopoulos G, Thatcher A, Petridou V, Bourtzi-Chatzopoulou E. Isolation of *Mycoplasma bovis* from bovine clinical mastitis cases in Northern Greece. J Vet 2005;1;1-3.
33. Fox LK, Kirk JH, Britten A. *Mycoplasma* Mastitis: A review of Transmisión and control. J Vet Med 2005;52 :153-160.
34. Richard GM, Olde Riekerink, Herman W, Barkema, Stefan Veenstra, Doris E, Randy PT, Dingwell, Keefe GP. Prevalence of contagious mastitis pathogens in bulk tank milk in Prince Edward Island. Can Vet J 2006;47.567-572.
35. Rosendal S, Gyles CL, Thoen CO Pathogenesis of bacterial infections in animal. Iowa State University Press. 1993:297.
36. Razin S, Yogev D, NaotY. Molecular biology and pathogenicity of Mycoplasmas Microbiology and molecular biology reviews,1998:1094-1156.
37. Dybvig K y LeRoy LV. Molecular biology of Micoplasmas. Annu Rev Microbiol 1996;50:25-27.
38. Howard WW, Rosenbusch FR, Lauerman HL, Micoplasmosis in animals: Mycoplasmosis committee of American association of veterinary laboratory diagnosis;1994. EE UU. Iowa State University Press.
39. Smith PF. The biology of *Mycoplasmas* Depaertament of Microbiology University of south Dakota Vermillion, Academic Press 1971.

40. Eichwald C, Friedrich I, Trelldenier H. Micoplasmosis de los animals. Editorial Acribia. Zaragoza España;1973.
41. Razin S, *The Mycoplasmas*. Microbiol Rev 1978;42:414-470.
42. Razin S and Tully JG. Cholesterol requirement of Mycoplasmas J Bacteriol 1970;2:306-310.
43. Maniloff J and Morowitz HJ. Cell biology of the *Mycoplasmas*. Bacteriol. Rev. American Society for Microbiology 1972;36: 263-290.
44. Rosengarten R, Behres A, Stetefeld A, Heller M, Ahrens M, Sachse K, *et al*. Antigen heterogeneity among isolates of *Mycoplasma bovis* is generated by high-frequency variation of diverse membrana surface proteins. Infect Immun 1994; 62:5066-5074.
45. Behrens A, Heller M, Kirchhoff H, Yogev D, Resengarten R. A family phase-variant membrane surface lipoprotein antigens (*Vsps*) of *Mycoplasma bovis*. Infect Immun 1994;62:5075-5084.
46. Robino P, Alberti A, Pittau M, Chessa Bernardo, Miciletta M, Nebbia P, Le Grand D, Rosati S. Genetic characterization of the surface lipoprotein P48 of *Mycoplasma bovis*. J Microbiol 2005;109:201-209.
47. Zhao Y, Wang H, Hmmond RJ, Liu Q, Roe BA, Davis RE. Predicted ATP=bindig cassette systems in the phythogenid mollicute Spiroplasma kunkeii. Mol Gen Genomics 2004;271:325-338.
48. Hopfe M, Birgit H. OppA, the substrate-Binding subnit of the oligopeptide permease, is the major Ecto - ATPase of Mycoplasma hominis. J Bacteriol 2004,1856: 1021-1028.

49. Asiya A, Froehlich BJ, Desai D, Stringer V, Scott R. Cov-R activation of the dipeptide permease promoter (*PddA*) in group a *Streptococcus*. *J Bacteriol* 2007;189:1407-1416.
50. David N, Gilbert MD, Robert C, Moellering, Jr MD, Merle A, Sande MD. Guide to antimicrobial therapy. The Stanford. Thirty.third Edition 2003.
51. Foddai, Idini G, Fusco M, Rosa N, De la Fe C, Zinellu S, *et al.*, Rapid differential diagnosis of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* based on a multiplex-PCR and a PCR-RFLP. *Mol and Cell Probes* 2005;19:207-212.
52. Freundt EA, and Edward FFDG. Classification and taxonomy THE *MYCOPLASMAS*. VOL. 1 Academic Press, Inc 1979:1-35.
53. Ghadersohi A, Fayazi Z, Hirst RG. Development of a monoclonal blocking ELISA for the detection of antibody to *Mycoplasma bovis* in dairy cattle and comparison to detection by PCR. *Vet Immunol Immunopathol.* 2005;104:183-193.
54. Ghadersohi A. y Coelen RJ. Development of a specific DNA probe and PCR for the detection of *Mycoplasma bovis*. *Vet Microbiol* 1997;56:87-98.
55. Hayman B, Hirst R. Development of a semi-nested PCR for the improved detection of *Mycoplasma bovis* from bovine milk and mucosal samples. *Vet Microbiol* 2002;91:91-100.
56. Hirose K, Kawasaki Y, Kotani K, Tanaka A, Ogawa H. Detection of *Mycoplasma* in mastitic milk by PCR analysis and culture method. *J Vet Med Sci* 2001;63:691-693.

57. http://www.oeidrus-portal gob.mx/repoAvance_siap/pecAvanceprod.jsp
58. McAuliffe L, Ellis RJ, Ayling D, Nicholas RAJ. Differentiation of *Mycoplasma* species by 16S ribosomal DNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting. J Clin Microbiol 2003;9:4844-4847.
59. Pinnow CC, Butler JA, Sachse K, Hotzel H, Timms LL, Rosenbusch RF. Detection of *Mycoplasma bovis* in preservative-treated field milk samples. J Dairy Sci 2001;84:1640-1645.
60. Razin S and Jacobs E. *Mycoplasmas* adhesion. J Gen Microbiol 1992;138:407-422.
61. Razin S, DNA probes and PCR in diagnosis of micoplasma infections. Mol and Cell Probes 1994;8:497-511.
62. Riffon R, Sayasith K, Khalil H, Dubret P, and Lagacé J. Development of a rapid sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. J Clin Microbiol 2001;39:2584-2589.
63. Sambrook J y Russell WD. Molecular cloning a laboratory manual Vol.1. 3rd ed. Cold Spring Harbor New York. Estados Unidos, 2001:6.61-6.62.
64. Tully JG. Cloning and filtration techniques for *Mycoplasmas*. En: Methods in mycoplasmology. Razin S y Tully JG. Estados Unidos: Academic Press 1983;173-177.

APÉNDICE I.

1.-Medio de cultivo de Hayflick.

Reactivo	Cantidad
PPLO ¹	2,1 g
Agua destilada	70 ml
Extracto de levadura deshidratada ² 10 %	10 ml
Esterilizar 121°C, 20 lb. Por 15 min.	
Rojo de fenol ³ 1 %	1 ml
Suero equino ⁴	20 ml
Glucosa ⁵	10 ml
Penicilina ⁶ 100,000 u/ml	1 ml

2.-Medio de cultivo de Hayflick sólido.

Reactivo	Cantidad
Agar Noble ⁷	0,56 g
Agua destilada	10 ml

Esterilizar 121°C, 20 lb. Por 15 min.

Para la preparación del medio sólido, Se licuó el agar previamente estéril y se agregó el medio líquido de Hayflick a una temperatura media para evitar que el agar se polimerice antes.

Reactivo	Cantidad
Hayflick liquido	60 ml
Agar Noble 0,8 %	10 ml

¹ Lab. DIFCO

² Lab. DIFCO

³ Lab. MERCK

⁴ Previamente estéril por filtración

⁵ Lab. OXOID

⁶ Lab. LA PISA

⁷ Lab. DIFCO

APÉNDICE II

PRODUCCIÓN DE MICOPLASMA EN 100 ml.

Cepa con 24 hrs. De incubación 2 ml.



Se agregó 8 ml de medio liquido Hayflick para aforar a 10 ml



Se agregó 40 ml de medio liquido Hayflick para aforar a 50 ml



Se alicuotó los 50 ml en 5 botellas con 10 ml

Cepa concentrada en 10 ml



Se agregó 10 ml de medio liquido Hayflick a c/u para aforar a 20 ml



Se obtuvo 100 ml de cepa en medio líquido Hayflick.

*

Se incubó 37° C en aerobiosis de 24 a 48 horas