



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**“DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE MICOPLASMAS
EN MUESTRAS DE CERDOS CON ENFERMEDAD
RESPIRATORIA, POR MEDIO DE CULTIVO
BACTERIOLÓGICO Y REACCIÓN EN CADENA DE LA
POLIMERASA (PCR)”.**

TESIS

Que para obtener el título de Médica Veterinaria

Zootecnista

Presenta

Vanessa Jetsabé López Félix

Asesoras:

DRA. Rosa Elena Miranda Morales

M.C. Verónica Rojas Trejo

Ciudad Universitaria, CDMX. 2021





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mis padres:

Gabino López y Ma. Cristina Félix, porque siempre han buscado la forma de darnos lo mejor, han sabido guiarme con sus consejos, sus experiencias, su comprensión, su amor y su confianza.

Gracias de verdad, por enseñarme a luchar por mis sueños y darme la oportunidad de lograr una meta más en mi vida profesional.

Son y serán siempre mi inspiración y sé que siempre podré contar con ustedes.

Los amo con todo mi corazón.

A mis hermanas:

Yanet y Elizabeth por ser mi ejemplo a seguir, mis confidentes y mis mejores amigas, gracias por confiar en mí y ser mi apoyo incondicional.

Son las mejores hermanas que pude tener.

No ha sido sencillo el camino hasta ahora, pero gracias a ustedes, lo complicado de lograr esta meta se ha notado menos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Doctora Rosa Elena Miranda Morales, por la confianza, porque a pesar de ponerme metas altas, me demostró que puedo lograrlas; por compartir conmigo sus conocimientos, su tiempo, su paciencia y por siempre estar pendiente de mí. Es una excelente persona a la que le tengo mucho cariño y una gran admiración.

A la Doctora Verónica Rojas Trejo, por sus enseñanzas, su cariño, su confianza y su comprensión, por brindarme su ayuda cuando lo necesitaba; agradezco inmensamente el interés, su apoyo incondicional en el proyecto y en mi vida. Gracias por cuidarme y preocuparse siempre.

A los miembros de mi jurado: MVZ. María del Rosario Esperanza Galván Pérez, MVZ. Rogelio Alejandro Alonso Morales, MVZ. Alejandra Mercadillo Sierra y MVZ. Alfredo Castañeda Ramírez por sus consejos para enriquecer este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio de Micoplasma y satélites externos, se convirtieron en una familia para mí, fue lindo compartir risas, comidas, salidas e incluso la limpieza con ustedes, son unos grandes amigos y si me necesitan estaré ahí para ustedes, gracias infinitas por sus consejos y su gran apoyo: Marlenne Maya, Tonatiuh López, Iván Jiménez, Gabriela Tapia, Estefanía Zúñiga, Yenny García y Liliana Tapia; los quiero muchísimo.

A todos mis amigos de la FMVZ, por ofrecerme esa mano amiga en los momentos más difíciles de la carrera, espero sean mis amigos siempre. Los extrañaré mucho y les deseo el mejor de los éxitos: Alicia Galindo, Karla Rodríguez, Ricardo Godínez, Abraham Dávalos, César Díaz, Rodrigo Alvarado, Wendy Hernández, Luis Ortega, Daniela Cabrera, Alan Rodríguez, Frida Bernal, Alan Mijangos y Diana Curiel.

Al Doctor Rolando Beltrán por su apoyo, sus consejos y por las herramientas de información.

A mis amigos de la P4 que extraño mucho: Donaldo Díaz y Daniela Flores.

Al Departamento de Microbiología e Inmunología Veterinaria.

Al Proyecto DGAPA PAPITT IN 222515 “Caracterización de la diversidad genética de *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos con problemas respiratorios”, por el financiamiento.

CONTENIDO

| | |
|--|------|
| DEDICATORIA..... | II |
| AGRADECIMIENTOS | III |
| CONTENIDO..... | V |
| FIGURAS | X |
| CUADROS | XII |
| ABREVIATURAS..... | XIII |
| RESUMEN | 1 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 3 |
| 1.1 Enfermedades respiratorias en cerdos..... | 3 |
| 1.2 Etiología | 4 |
| 1.3 Distribución del CRP | 5 |
| 1.4 Problemas respiratorios en cerdos por <i>Mycoplasmas</i> | 7 |
| 1.5 Distribución de la Micoplasmosis | 8 |
| 1.6 Pérdidas económicas por enfermedad respiratoria por <i>Mycoplasma spp.</i> | 9 |
| 1.7 Antecedentes históricos de los micoplasmas..... | 10 |
| 1.8 Generalidades del género <i>Mycoplasma spp.</i> | 11 |
| 1.9 Características ultraestructurales..... | 13 |

| | | |
|--------|--|----|
| 1.10 | Cultivo <i>in vitro</i> | 13 |
| 1.11 | <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> | 14 |
| 1.11.1 | Mecanismos de patogenicidad y virulencia | 14 |
| 1.11.2 | Transmisión..... | 16 |
| 1.11.3 | Patogenia | 17 |
| 1.11.4 | Presentación clínica | 18 |
| 1.11.5 | Lesiones macroscópicas | 19 |
| 1.11.6 | Lesiones microscópicas. | 20 |
| 1.12 | <i>Mycoplasma hyorhinis</i> | 21 |
| 1.12.1 | Variabilidad antigénica | 22 |
| 1.12.2 | Transmisión..... | 22 |
| 1.12.3 | Presentación clínica | 22 |
| 1.12.4 | Lesiones | 23 |
| 1.13 | <i>Mycoplasma hyosynoviae</i> | 24 |
| 1.13.1 | Transmisión..... | 24 |
| 1.13.2 | Presentación clínica | 25 |
| 1.13.3 | Lesiones | 26 |
| 1.14 | Diagnóstico de la micoplasmosis | 26 |
| 1.14.1 | Bacteriología | 27 |
| 1.14.2 | Serología | 27 |

| | |
|---|----|
| 1.14.3 Biología molecular | 27 |
| 2. JUSTIFICACIÓN..... | 28 |
| 3. HIPÓTESIS..... | 29 |
| 4. OBJETIVOS | 30 |
| 4.1 OBJETIVO GENERAL | 30 |
| 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 30 |
| 5. MATERIAL Y MÉTODOS | 31 |
| 5.1 Muestras | 31 |
| 5.1.1 Recolección de muestras de pulmones | 32 |
| 5.1.2 Recolección de muestras de hisopo nasal..... | 32 |
| 5.2 Cepas de referencia..... | 33 |
| 5.3 Curva de crecimiento (viabilidad) | 33 |
| 5.4 Procesamiento de las muestras clínicas..... | 35 |
| 5.4.1 Método 1: Procesamiento de las muestras de pulmón | 37 |
| 5.4.2 Método 2: Procesamiento de las muestras de hisopo nasal..... | 39 |
| 5.4.3 Método 3: Procesamiento de las muestras filtradas de hisopo nasal | 42 |
| 5.5 Concentrado de las diluciones..... | 43 |
| 5.6 Extracción de ADN..... | 44 |
| 5.7 Cuantificación de ADN | 45 |
| 5.7.1 Cepas de referencia | 45 |

| | | |
|---------|---|----|
| 5.7.2 | Muestras clínicas | 46 |
| 5.8 | Integridad de ADN por electroforesis. | 46 |
| 5.9 | PCR..... | 47 |
| 5.9.1 | Iniciadores | 47 |
| 5.9.1.1 | <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> | 48 |
| 5.9.1.2 | <i>Mycoplasma hyorhinis</i> | 49 |
| 5.9.1.3 | <i>Mycoplasma hyosynoviae</i> | 50 |
| 5.10 | Reacción de PCR. | 51 |
| 5.11 | Condiciones de la PCR..... | 52 |
| 5.12 | Electroforesis para la visualización de productos amplificados por la PCR. | 53 |
| 6. | RESULTADOS | 53 |
| 6.1 | Curva de crecimiento. | 53 |
| 6.2 | Identificación de colonias compatibles con micoplasmas en muestras clínicas y cepas de referencia en los diferentes métodos..... | 57 |
| 6.2.1 | Método 1 | 58 |
| 6.2.2 | Método 2..... | 60 |
| 6.2.3 | Método 3..... | 61 |
| 6.3 | Concentración de ADN amplificada por la PCR..... | 62 |
| 6.3.1 | Cepas de referencia..... | 62 |

| | |
|--|----|
| 6.3.2 Muestras clínicas | 66 |
| 6.4 Identificación de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> , <i>Mycoplasma hyorhinis</i> y <i>Mycoplasma hyosynoviae</i> por PCR en los diferentes métodos. | 66 |
| 6.4.1 Método 1 | 66 |
| 6.4.2 Método 2 | 70 |
| 6.4.3 Método 3 | 70 |
| 7. DISCUSIÓN | 73 |
| 7.1 Identificación de formas similares a Micoplasmas. | 73 |
| 7.2 Identificación molecular de especies de micoplasmas en muestras clínicas. ... | 74 |
| 8. CONCLUSIONES | 77 |
| 9. REFERENCIAS | 78 |
| 10. ANEXO | 90 |
| 10.1 Medio de cultivo de Friis | 90 |

FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Método para la curva de crecimiento de las tres cepas de referencia..... | 35 |
| Figura 2. Métodos para el procesamiento de las muestras clínicas. | 36 |
| Figura 3. Método 1 para el procesamiento de muestras de pulmón incubadas en 3, 7 y 15 días. | 39 |
| Figura 4. Método 2 para el procesamiento de muestras de hisopo nasal incubadas en 4, 10, 20 y 30 días..... | 41 |
| Figura 5. Método 3 para el procesamiento de muestras de hisopo nasal a los 9 días de incubación. | 43 |
| Figura 6. Condiciones de temperatura de la PCR | 52 |
| Figura 7. Curva de crecimiento de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> durante 15 días de incubación. | 54 |
| Figura 8. Curva de crecimiento de <i>Mycoplasma hyosynoviae</i> durante 15 días de incubación. | 54 |
| Figura 9.. Curva de crecimiento de <i>Mycoplasma hyorhinis</i> durante 15 días de incubación. | 55 |
| Figura 10. Curva de crecimiento de las tres especies de micoplasmas durante 15 días de incubación. | 56 |
| Figura 11. Formas similares a micoplasma a partir de muestra clínica..... | 57 |
| Figura 12. Colonias de micoplasmas de las cepas de referencia en el medio semisólido de Friis observadas en microscopio estereoscópico a 3.5X. A/(<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>), B (<i>Mycoplasma hyosynoviae</i>) y C (<i>Mycoplasma hyorhinis</i>)... | 58 |

Figura 13 (A, B y C). Productos de la PCR de la ARN ribosomal 16S de las diluciones de *Mycoplasma hyopneumoniae* ATTC 25617 en gel de agarosa al 1.5%. 63

Figura 14. Productos de PCR de la ARN ribosomal 16S de las diluciones de *Mycoplasma hyosynoviae* (585 pb), en gel de agarosa al 1.5%. 64

Figura 15. Productos de PCR de la ARN ribosomal 16S de las diluciones de *Mycoplasma hyorhinis* ATCC 23234 (1,129 pb), en gel de agarosa al 1.5%. 65

Figura 16. Productos de la PCR, para la ARN ribosomal 16S de *Mycoplasma hyopneumoniae*, en gel de agarosa al 1.5%. 67

Figura 17. Productos de la PCR, para la ARN ribosomal 16S de *Mycoplasma hyosynoviae* (585/pb), en gel de agarosa al 1.5%. 68

Figura 18. Productos de PCR de la ARN ribosomal 16S de *Mycoplasma hyopneumoniae* fragmento F3 (588 pb), en gel de agarosa al 1.5%, de las muestras filtradas de hisopo nasal incubadas por 9 días..... 72

CUADROS

| | |
|---|----|
| Cuadro 1. Etiología y porcentaje de casos de neumonía porcina, según lo determinado por diagnóstico histopatológico en el ISUVDL (2003-2014)..... | 6 |
| Cuadro 2. Especies de Micoplasmas en cerdos..... | 11 |
| Cuadro 3. Clasificación taxonómica de los micoplasmas..... | 12 |
| Cuadro 4. Número de muestras por zona de estudio..... | 31 |
| Cuadro 5. Iniciadores para las diferentes especies de Mycoplasma spp. | 47 |
| Cuadro 6. Reacción de PCR | 51 |
| Cuadro 7. Condiciones de la PCR..... | 52 |
| Cuadro 8. Colonias similares a micoplasma en muestras de pulmón. | 59 |
| Cuadro 9. Colonias similares a micoplasma en muestras de hisopos nasales. | 60 |
| Cuadro 10. Colonias similares a micoplasma en muestras de hisopos nasales filtrados. | 61 |
| Cuadro 11. Concentración de ADN en ng / 10 µl amplificada por la PCR..... | 62 |
| Cuadro 12. Concentración de ADN en ng / 10 µl en muestras clínicas..... | 66 |
| Cuadro 13. PCR para la ARN ribosomal 16S (Método 1) | 69 |
| Cuadro 14. PCR para la ARN ribosomal 16S (Método 2) | 70 |
| Cuadro 15. PCR para la ARN ribosomal 16S (Método 3) | 71 |

ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|--|
| (-) | Negativo |
| (+) | Positivo |
| µl | Microlitro (´s) |
| µm | Micrómetro (´s) |
| °C | Grados centígrados |
| € | Euros |
| A | Adenina |
| ADN | Ácido Desoxirribonucleico |
| ARN | Ácido Ribonucleico |
| ARNr | Ácido Ribonucleíco ribosomal |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| ATP | Adenosin Trifosfato |
| C | Citosina |
| CA | Conversión alimenticia |
| CRP | Complejo Respiratorio Porcino |
| cm ³ | Centímetros cúbicos |
| DNTP | Di Nucleótido Trifosfato |
| ELISA | Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas |
| FMVZ | Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia |
| Fw | Forward |
| G | Guanina |

| | |
|-------------------|---|
| GDP | Ganancia diaria de peso |
| Gr | Gramos |
| IAV-S | Virus de la Influenza tipo A |
| Kb | Kilo base |
| KDa | Kilo Dalton |
| M | Molar |
| MgCl ₂ | Cloruro de Magnesio |
| Mhp | <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> |
| ml | Mililitro |
| Mm | Milímetro |
| mM | Micromol |
| NEP | Neumonía Enzoótica Porcina |
| Ng | Nanogramo |
| Nm | Nanómetro |
| nm λ | Longitud de onda de máxima absorción |
| OD | Densidad óptica |
| PBS | Solución Buffer de Fosfatos |
| Pb | Pares de bases |
| PCR | Reacción en Cadena de la Polimerasa |
| PCR | Reacción en Cadena de la Polimerasa Punto final |
| PCV2 | Coronavirus Porcino tipo 2 |
| pH | potencial de hidrógeno |
| pmol | Picomol |

| | |
|--------|--|
| PPLO | Organismos Asociados a Pleuroneumonía |
| PRRSV | Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino |
| q.b.p. | Cuanto baste para |
| Rw | Reverse |
| Rpm | Revoluciones por minuto |
| T | Timina |
| Taq | <i>Thermus aquaticus</i> |
| UI | Unidades Internacionales |
| UFC | Unidades formadoras de colonias |
| UNAM | Universidad Nacional Autónoma de México |
| V | Volts |
| Vlp | Lipoproteínas variables de membrana |

RESUMEN

LÓPEZ FÉLIX VANESSA JETSABÉ. Determinación de la presencia de micoplasmas en muestras de cerdos con enfermedad respiratoria, por medio de cultivo bacteriológico y reacción en cadena de la polimerasa (PCR), bajo la supervisión de la Dra. Rosa Elena Miranda Morales y M.C. Verónica Rojas Trejo.

Las enfermedades respiratorias en cerdos son importantes a nivel mundial, debido a que son responsables de aproximadamente el 44% de las muertes en la etapa de destete y del 61% durante las etapas de crecimiento y finalización. Entre los patógenos asociados a estas enfermedades, se encuentran virus y bacterias, y entre estos últimos, se encuentran los micoplasmas. Las especies más importantes en la industria porcina son: *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyosynoviae* y *Mycoplasma hyorhinis*; caracterizadas por ser bacterias altamente exigentes en cultivo *in vitro*, por lo que su aislamiento puede tardar hasta 30 días.

La finalidad del presente estudio fue identificar la presencia de estos microorganismos, en muestras de pulmón e hisopos nasales de cerdos con lesiones sugerentes a micoplasmosis o sinología clínica de enfermedad respiratoria, en el menor tiempo posible.

Se analizaron un total de 110 muestras clínicas (63 pulmones de animales sacrificados en rastro y 47 hisopos nasales de cerdos provenientes de una unidad

de producción), los cuales fueron procesados e incubados en diferentes tiempos (entre 3 y 30 días) en medio de cultivo Friis, utilizando cepas de referencia como control positivo.

Cada muestra fue evaluada para observar la presencia de formas similares a colonias de *Mycoplasma* y se realizó su identificación molecular por la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa, Punto final), con la detección de un fragmento del gen ARN ribosomal 16S.

Los resultados del estudio mostraron que 39 (35.45 %) de las muestras trabajadas fueron positivas a la visualización de formas similares a *Mycoplasma* a diferentes días de incubación (25 de pulmón y 14 hisopos nasales). Y con la técnica de PCR fue posible identificar 2/63 (3.17 %) muestras de pulmón positivas a *Mycoplasma hyopneumoniae* a los 7 días de incubación y 2/63 (3.17 %) muestras positivas a *Mycoplasma hyosynoviae* a los 7 y 15 días. En muestras de hisopo nasal, se obtuvieron 10/22 (45.45 %) muestras positivas a *Mycoplasma hyopneumoniae* al día 9 de incubación. Sin ninguna muestra positiva para *Mycoplasma hyorhinis*, lo cual indica una seria dificultad para el aislamiento de estos organismos y una baja sensibilidad de la PCR de este microorganismo.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedades respiratorias en cerdos

Las enfermedades respiratorias en cerdos son muy comunes a nivel mundial y suponen un importante problema sanitario a nivel de granjas. Comprometen el bienestar de los animales y ocasionan un impacto económico muy alto que repercute en la rentabilidad de la industria porcina. Como muchas enfermedades en cerdos, las respiratorias conllevan a una reducción en el rendimiento productivo por la disminución en la tasa de crecimiento y conversión alimenticia, provocan un aumento en la mortalidad, alto riesgo de transmisión entre animales, gastos por tratamientos y pérdida de calidad en las canales que puede suscitar el decomiso de éstas en rastros (Ross R., *et al.*, 1999).

Las enfermedades respiratorias en cerdos son responsables de aproximadamente el 44% de las muertes en la etapa de destete y del 61% durante las etapas de crecimiento y finalización en los Estados Unidos de América (USDA, 2007). Existen datos en Argentina que indican que por cada incremento del 1% en el daño del parénquima pulmonar se incrementa 1.2 días más el tiempo a la venta; es decir, si el daño observado a la necropsia o en el rastro es del 10%, indicaría que el cerdo al menos estuvo 12 días más en los corrales con su respectivo consumo extra de alimento, con una disminución en la ganancia de peso de al menos 37 gr/día. Asimismo, esta pérdida puede ser mayor o menor de acuerdo con el o los agentes involucrados (PISA Agropecuaria, 2014).

1.2 Etiología

Las enfermedades respiratorias son el resultado de una compleja interacción en la que pueden verse involucrados gran número de agentes etiológicos; por lo que habitualmente se habla de un "Complejo Respiratorio Porcino (CRP)", (Jordan D., 2006), además también intervienen factores medioambientales y factores epidemiológicos (Lobo E., 2005).

Los microorganismos asociados a la infección primaria en el CRP son principalmente de origen viral, tales como el Circovirus porcino tipo II (PCV2), el virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRSV) y el virus de la Influenza A (IAV-S), considerándose a los últimos dos, como los agentes virales primarios más importantes en este complejo (Arredondo J., 2019). Dentro de los agentes bacterianos, *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhp), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) y *Haemophilus parasuis* juegan un papel central en la enfermedad. El resto de las bacterias involucradas tienen un papel secundario como *Bordetella bronchiseptica* y *Pasteurella multocida*, con algunas excepciones como *Streptococcus suis*, descrita en casos de alto impacto clínico o productivo en la etapa post destete (Fano G., 2019).

Dentro de los factores epidemiológicos se señalan a aquellos que influyen en la capacidad de los microorganismos para extenderse en una población dada: como lo son las enfermedades presentes en la unidad de producción y su morbilidad, así como la edad y la constitución genética de los individuos; mientras que en los factores medioambientales se mencionan: el clima, la densidad de población, la

alimentación, la concentración de amoníaco, la ventilación, la temperatura, la condición de las instalaciones y el manejo (Lobo E., 2005).

Dada la característica multifactorial y las múltiples combinaciones de los diferentes factores, existe una variabilidad en la manifestación de los signos clínicos, que pueden ser: depresión, fiebre, falta de apetito, disnea, emaciación y la presencia de tos seca o productiva, lo que deriva en una demanda constante de monitoreo y ajuste en los esquemas de intervención (Velazco J., 2012).

1.3 Distribución del CRP

El Complejo Respiratorio Porcino es un problema a nivel mundial, las estimaciones sobre su prevalencia varían dependiendo de la población muestreada, el sesgo de selección, el área geográfica, los criterios y pruebas de diagnóstico aplicados (Zoetis, 2016).

En el 2016, el laboratorio de diagnóstico veterinario de la Universidad Estatal de Iowa (ISUVDL) reportó la frecuencia de casos de enfermedad respiratoria porcina causados por el virus de la Influenza Porcina Tipo A (IAV-S), el virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRSV) y por *Mycoplasma hyopneumoniae*, con diagnóstico confirmado por pruebas de laboratorio como aislamiento, serología e histopatología durante 12 años (2003-2014), a partir de muestras de pulmón de cerdos en etapa de finalización en Estados Unidos (Schwartz K., 2016).

El **Cuadro 1**, muestra que el porcentaje de casos reportados como positivos a alguno de los tres microorganismos, se mantuvo constante durante los 12 años. La identificación de *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhp) varió dentro de un rango del 5% al 11% del total de casos, el virus de la Influenza Porcina Tipo A (IAV-S) se encontró entre el 15% al 36% y el virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRSV) se mantuvo relativamente constante dentro del rango de 26% a 32% con la excepción del año 2011 donde aumentó hasta un 39% (Schwartz K., 2016).

| Cuadro 1. Etiología y porcentaje de casos de neumonía porcina, según lo determinado por diagnóstico histopatológico en el ISUVDL (2003-2014). | | | |
|--|--|--|---|
| Agente etiológico | | | |
| Año | <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> (Mhp) | Virus de la influenza A (IAS-V) | Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRSV) |
| 2003 | 8 % | 16 % | 29 % |
| 2004 | 7 % | 15 % | 26 % |
| 2005 | 6 % | 17 % | 26 % |
| 2006 | 7 % | 16 % | 29 % |
| 2007 | 5% | 15 % | 27 % |
| 2008 | 6 % | 18 % | 30 % |
| 2009 | 8 % | 22 % | 29 % |
| 2010 | 10 % | 26 % | 32 % |
| 2011 | 11 % | 31 % | 39 % |
| 2012 | 9 % | 33 % | 32 % |
| 2013 | 8 % | 37 % | 31 % |
| 2014 | 8 % | 36 % | 32% |

Aunque los datos del ISUVDL muestran que, de los tres agentes etiológicos, *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhp) es el menos común, las infecciones causadas por este microorganismo son importantes, debido a que puede ser responsable de problemas respiratorios crónicos que desembocan en grandes pérdidas económicas a la industria porcina (Holst S., *et al.*, 2015).

1.4 Problemas respiratorios en cerdos por Micoplasmas

La micoplasmosis porcina, comprende una serie de procesos patológicos producidos por microorganismos pertenecientes al género *Mycoplasma spp.* De estos, *Mycoplasma hyopneumoniae* es considerado el más importante, debido a que causa una neumonía crónica conocida como Neumonía Enzoótica Porcina (NEP) en animales en crecimiento y finalización (Ross R., 1999), estimando que más del 93% de las granjas y el 80% de los cerdos en todo el mundo están infectados (Maes D., 2008).

Se han descrito infecciones concomitantes entre *Mycoplasma hyopneumoniae* y otros micoplasmas capaces de actuar como patógenos respiratorios. Tal es el caso de *Mycoplasma hyorhinis*, un habitante comensal del tracto respiratorio superior de lechones sanos hasta las 10 semanas, reconocido como agente causante de poliserositis, artritis, otitis, abortos y en ocasiones neumonía (Rovira A., *et al.*, 2010); y *Mycoplasma hyosynoviae* un microorganismo de distribución mundial (Kobisch M. y Friis N., 1996), descrito como causante de artritis y poliartritis (Hagedorn-Olsen T., *et al.*, 1999), considerado como el principal agente responsable de cojera aguda e intensa en cerdos durante el periodo de

crecimiento (Nielsen, *et al.*, 2001), pero al colonizar también la tonsila palatina, puede descender al tracto respiratorio bajo contribuyendo a la presencia de neumonías, hecho que ocurre con una frecuencia de hasta 10% (Friis N., 1971).

Todas las infecciones producidas por Micoplasmas predisponen al hospedador a la aparición de enfermedades bacterianas o virales secundarias (Ross R., 1996), debido a sus características inmunosupresoras, dichas infecciones secundarias agravan el cuadro clínico y la severidad de las lesiones pulmonares (Thacker E. y Minion F., 2012).

1.5 Distribución de la Micoplasmosis

La enfermedad respiratoria causada por Micoplasmas se encuentra distribuida en las regiones de más alta producción del mundo (Armstrong C., 1982).

En México, Morilla A. (2016) describe en su Manual para el Control de las Enfermedades Infecciosas de los Cerdos, que en más del 80% de las granjas de ciclo completo se han encontrado animales con anticuerpos contra *Mycoplasma spp.*, por lo que es habitual encontrar pulmones con lesiones típicas de esta enfermedad en los diferentes rastros del país; alcanzando niveles superiores al 60% (Carranza A., 2006), sin embargo, los datos específicos sobre la prevalencia de *Mycoplasma spp.* por país no están disponibles en la literatura, ya que la enfermedad no se considera de notificación obligatoria y no limita el intercambio comercial (Maes D., 2017).

1.6 Pérdidas económicas por enfermedad respiratoria por *Mycoplasma spp.*

El costo de la enfermedad respiratoria solo por micoplasmas o en combinación con otros agentes etiológicos es difícil de valorar, encontrándose entre uno de los desafíos sanitarios con mayores pérdidas económicas, siendo altamente influenciado por las prácticas de manejo y las condiciones de la granja (Bandrick M., 2014).

En un estudio publicado en España por Bringas J., *et. al.* en el 2014, se evaluaron las lesiones presentes en 48,778 pulmones de cerdos provenientes de granjas positivas a *Mycoplasma spp.*; con el objetivo, de establecer el impacto de estas lesiones sobre el rendimiento productivo de los animales y su impacto económico. Los parámetros de producción evaluados fueron: Ganancia Diaria de Peso (GDP), Conversión Alimenticia (CA), % de mortalidad y costo de medicación en euros (€). Los resultados indicaron que dado a que la tasa de mortalidad es reducida, las mayores pérdidas económicas son debido a la disminución de 70 gramos en la Ganancia Diaria de Peso y un aumento de 0.07% en el índice de Conversión Alimenticia en cerdos con hasta un 25% de lesiones pulmonares, más el costo de medicación, pudiendo llegar hasta 2.7 € por cerdo.

1.7 Antecedentes históricos de los micoplasmas

En 1898 se describieron por primera vez a los microorganismos autorreplicables más pequeños, denominados en la actualidad como micoplasmas. Estos microorganismos exhiben características morfológicas, metabólicas y moleculares muy particulares cuya importancia ha generado interés en el estudio de enfermedades. La especificidad de estos, con respecto a su hospedador es bastante alta, siendo descritos actualmente 77 especies, de las cuales 28 de ellas son patógenas para el hombre, animales domésticos y salvajes (Topley W. y Wilson's G., 1990).

De los micoplasmas que afectan a los cerdos (**Cuadro 2**), la primera descripción sobre la Neumonía Enzoótica Porcina (NEP), fue en Alemania 1930, pero el aislamiento y cultivo del agente causal, sólo fue logrado en 1965 por Goodwin en el Reino Unido, al mismo tiempo que Maré C. y Switzer W. en Estados Unidos de América. Los primeros autores lo denominaron, *Mycoplasma suis pneumoniae*, y los segundos *Mycoplasma hyopneumoniae*, denominación utilizada en la actualidad (Kobisch M. y Friis N., 1996).

Mycoplasma hyorhinis fue descrito en 1955, cuando Switzer W., como parte de un estudio para determinar las causas de rinitis atrófica infecciosa, aisló de la cavidad nasal de cerdos lo que denominó pleuropneumonia like microorganism o microorganismo similar al causante de pleuroneumonía (Friis N. y Fenestra A., 1994).

Finalmente, *Mycoplasma hyosynoviae* fue descrito por primera vez como una nueva especie por Ross R. y Karmon J. en 1970. Fue aislado simultáneamente del tracto respiratorio superior e inferior de cerdos en Dinamarca (Friis N., 1971) y de las vías respiratorias y articulaciones en Inglaterra (Gois M. y Taylor-Robinson D., 1972).

| Cuadro 2. Especies de Micoplasmas en cerdos. | | |
|---|-----------------------------------|--|
| Especie | Fecha de aislamiento | Presentación clínica |
| <i>M. hyopneumoniae</i> | Maré C. y Switzer W., 1965 | Neumonía Enzoótica Porcina (NEP) |
| <i>M. hyorhinis</i> | Switzer W., 1955 | Neumonía, artritis, pericarditis, poliserositis, otitis, neumonía, abortos |
| <i>M. hyosynoviae</i> | Ross R. y Karmon J., 1970 | Poliartritis, artritis, neumonía |
| <i>M. flocculare</i> | Meyling A. y Friis N., 1972 | Apatógeno |
| <i>M. hyopharyngis</i> | Erickson B., <i>et al.</i> , 1986 | Apatógeno |
| <i>M. suis</i> | Splitter E., 1950 | Anemia Infecciosa Porcina |

1.8 Generalidades del género *Mycoplasma spp.*

Los micoplasmas pertenecen a la clase *Mollicutes* (**Cuadro 3**), término derivado del latín *mollis* = suave o fino y *cutes* = *piel* que significa “piel blanda o suave”, se caracterizan por carecer de pared celular o precursores químicos del peptidoglucano, propiedad que los hace resistentes a los antibióticos β -lactámicos, y sensibles a la lisis por choque osmótico, detergentes, alcoholes y a la desecación (Nicolet J., 1996).

Son los microorganismos más pequeños (0.1-0.25 μm) capaces de replicarse en medios de cultivo exentos de células, son descritos como Gram positivos y

presentan formas pleomórficas que van desde esféricos, ligeramente cocoides o piriformes hasta filamentos helicoidales, que en medio sólido al 0.9% de agar se observan como colonias típicas en forma de “huevo frito” de 10 a 500 µm de diámetro (Tully J., 1983), son filtrables a través de membranas de 0.45 µm, tienen un genoma que va de 577 a 2200 pb y un 23-41% de Guanina- Citocina (G-C).

| Cuadro 3. Clasificación taxonómica de los micoplasmas. | | | |
|---|--|---------------------------|--------------------------|
| Clase | <i>Mollicutes</i> | | |
| Orden | <i>Mycoplasmatales</i> | | |
| Familia | <i>Mycoplasmataceae</i> | <i>Acholeplasmateceae</i> | <i>Spiroplasmataceae</i> |
| Género | <i>Mycoplasma</i> <i>Ureaplasma</i> | <i>Acholeplasma</i> | <i>Spiroplasma</i> |

Los mollicutes presentan un ciclo del ácido tricarboxílico incompleto y carecen de quinonas o citocromos, lo que impide que se lleve a cabo el proceso de fosforilación oxidativa, la ruta metabólica que produce ATP con mayor rendimiento (Brown D., *et al.*, 2010). Generalmente emplean azúcares o arginina como fuente principal de energía, aunque algunas especies pueden emplear ambas, o bien fuentes alternativas como piruvato y/o ácidos orgánicos. Por otra parte, el colesterol es un requerimiento para el crecimiento de algunos de estos microorganismos (Miles R. y Agbanyim C., 1998; Brown D., *et al.*, 2010).

1.9 Características ultraestructurales

Una característica de los micoplasmas es que poseen una membrana plasmática flexible, con alto contenido de proteínas (50-59%), lípidos: principalmente fosfolípidos y glucolípidos (35-40%) y una fracción de carbohidratos (2%), siendo está, la única barrera que los separa del medio ambiente.

En su citoplasma se pueden encontrar ribosomas, gránulos citoplasmáticos, moléculas bicatenarias circulares de ADN y moléculas de ARN. No poseen flagelos, aunque algunas especies muestran motilidad mediante el deslizamiento (Quinn P., *et al.*, 2002).

1.10 Cultivo *in vitro*

Los micoplasmas son exigentes en sus requerimientos nutricionales, son considerados como microorganismos de difícil crecimiento ya que para su cultivo *in vitro* requieren características y condiciones atmosféricas especiales. Por ello se utilizan medios de cultivo enriquecidos, que contienen suero sanguíneo que proporciona esteroides y extracto de levadura que le provee de NAD; una fuente de energía como glucosa, así como ácidos nucleicos, vitaminas y la adición de un indicador de pH, como el rojo de fenol, que facilite la detección de procesos metabólicos realizados por la especie en crecimiento e incluso se les adiciona una solución de sales que mejora la estabilidad osmótica del medio (Kobisch M. y Friis N., 1996). Por lo general los cultivos se pasan varias veces a medio líquido en una atmósfera de aerobiosis y al mismo tiempo, se inoculan en medio semisólido y se

incubaban a una atmosfera de 5-10% de dióxido de carbono y 80% de humedad (Razin S. y Herrmann R., 2002).

1.11 *Mycoplasma hyopneumoniae*

M. hyopneumoniae se describe con un tamaño medio de 0.20 µm, inmóvil. Presenta una membrana de 10 nm de espesor y una cápsula (Desroseirs R., 2001).

Mycoplasma hyopneumoniae puede ser cultivado *in vitro*, pero se caracteriza por ser de difícil aislamiento y lento crecimiento a comparación de otros micoplasmas. En cultivos primarios, produce poca turbidez y un cambio para pH ácido entre 3 y 30 días de incubación (Sibila M., *et al.*, 2009). En medio semisólido, las colonias son apenas visibles después de 2-3 días de inoculación, incrementando gradualmente su medida, alcanzando un tamaño hasta de 0.5 mm sin la típica área central. La atmósfera ideal para su crecimiento es con un 10% de CO₂, en un pH de 7.4 y una temperatura de 37-38°C (Zhang Q., 2005). Este microorganismo fermenta la glucosa, pero no hidroliza la arginina, ni la urea (Wolley *et al.*, 2012).

1.11.1 Mecanismos de patogenicidad y virulencia

Los mecanismos utilizados por *Mycoplasma hyopneumoniae* para infectar son la adherencia a los cilios traqueobronquiales, ciliostasis y efectos citotóxicos sobre la célula colonizada (Fano G., *et al.*; 2007).

- Adhesión

Mycoplasma hyopneumoniae presenta una cápsula que se cree, favorece la adhesión al tejido hospedador y la evasión de la respuesta inmune celular al dificultar o inhibir los procesos de fagocitosis (Calsamiglia M., 2004).

Además, *Mycoplasma hyopneumoniae* posee adhesinas como la P97, P102 y P159; localizadas en la superficie celular, que funcionan como receptores de heparina, plasminógeno y fibronectina, lo que influye en la capacidad de adhesión de *M. hyopneumoniae* y el efecto citopático producido en células del hospedador (Maes D., *et al.*; 2008).

- Citotoxicidad

Se ha descrito que las lipoproteínas de la superficie celular o proteínas de membrana asociadas a lípidos (LAMP), están implicadas en la apoptosis a través de la activación de las caspasas 3 y 8 *in vitro* en varios tipos de células, incluidas las células mononucleares de sangre periférica porcina (Bai F., *et al.*, 2015). Además, los LAMP activan la producción de óxido nítrico (NO) y especies reactivas de oxígeno (ROS) como el H₂O₂ en la célula huésped (Ferrarini M. *et al.*, 2016).

1.11.2 Transmisión

La transmisión de *Mycoplasma hyopneumoniae* ocurre por contacto directo con animales infectados, debido a la producción de exudado y secreciones que se propagan a través de aerosoles por medio de tos o estornudos, que es como la infección se mantiene activa por periodos prolongados de tiempo en las poblaciones (Czaja T., *et al.*; 2002).

Se describen tres momentos importantes de riesgo durante la vida de los cerdos, el primero es de transmisión vertical, por el contacto con la madre infectada (las multíparas diseminan menos que las primerizas), durante la primera semana de vida. El segundo se da en el destete, de manera horizontal al mezclar a las crías. Y finalmente el tercero, cuando los animales son trasladados a corrales de engorda, provocando altos niveles de estrés y al entrar en contacto con animales probablemente infectados (Surprenant C., 2001).

No hay transmisión del agente mediante vía transplacentaria y por vía lactogénica aún no ha sido demostrada, pero si se conoce la transmisión por la vía sexual, a través del semen (Desrosiers R., 2001).

1.11.3 Patogenia

Mycoplasma hyopneumoniae se localiza primariamente en la superficie de la tráquea, bronquios y bronquíolos, ubicándose en el ápice de los cilios (Wolley, et al., 2012).

La adherencia del microorganismo a los cilios parece estar asociada principalmente con la expresión de la proteína P97 en la superficie del microorganismo, sin embargo, se han descrito otras proteínas que pueden jugar un papel importante en la adhesión del microorganismo (Djordjevic S., 2004).

Una vez que *Mycoplasma hyopneumoniae* coloniza el epitelio respiratorio, tiene la habilidad de mantenerse y establecer una infección crónica, la cual depende, por una parte, de la respuesta inflamatoria y proliferativa del hospedador y por la otra, de la evasión o alteración de la respuesta inmune (Ross R., 1996).

A medida que la infección del epitelio traqueobronquial progresa, se produce una reducción de la actividad ciliar, una pérdida gradual de los cilios, formación de microcolonias y acumulación de microorganismos en las células epiteliales remanentes (DeBey M., 1992), lo que genera una movilización de células linfoides que ejercen presión sobre los tejidos vecinos y obstruyen la luz de los bronquíolos, causando un colapso de los alveolos. Al final del proceso, los cilios desaparecen, las células epiteliales son destruidas y exfoliadas, presentándose un exudado viscoso en las vías aéreas como consecuencia de una hipersecreción, junto con la

alteración del mecanismo de eliminación del moco traqueo bronquial (Bachmann V. *et al.*; 2006).

Mycoplasma hyopneumoniae también es capaz de inducir la liberación de citocinas, entre las cuales se ha demostrado que la IL-10 posee efecto inmunosupresor, lo cual ejerce una reducción en la función de los polimorfonucleares en las vías respiratorias del cerdo, lo que favorece el establecimiento de infecciones secundarias (Salazar J. y Loaiza U., 2014).

1.11.4 Presentación clínica

Los animales más afectados son los cerdos en etapa de engorda, pero en algunos casos la sintomatología puede aparecer a las tres o cuatro semanas de edad dependiendo del manejo de los animales. El principio de la enfermedad se caracteriza por la presencia de tos de aparición lenta, a partir de los 6 días post-infección, con un pico a los 27 días y prácticamente desaparecer a los dos meses (Sorensen V., *et al.*, 2002).

La gravedad de los síntomas depende de la presencia de infecciones secundarias, si la infección por *Mycoplasma hyopneumoniae* no sufre complicaciones con otros agentes, la enfermedad puede cursar subclínicamente, con tos seca no productiva, fiebre leve y anorexia. Si existen complicaciones secundarias, la enfermedad puede adoptar un curso clínico con tos productiva, fiebre alta, anorexia, disnea y postración, pudiendo ocurrir la muerte de los animales, entre 4 y 6 meses de edad. La forma aguda de la enfermedad presenta una mortalidad

de 5% y morbilidad de hasta 100%; la forma crónica (más común) se observa en granjas infectadas de manera enzoótica (Pieters M., 2014).

1.11.5 Lesiones macroscópicas

Las lesiones macroscópicas consisten en áreas de consolidación de color grisáceo a púrpura de consistencia firme y más pesada que el tejido normal, que se encuentran bien delimitadas del tejido sano. Se observan principalmente en los lóbulos craneales (apicales), medio (cardiaco), accesorio y tercios craneales de los lóbulos caudales (diafragmáticos); debiéndose posiblemente a factores aerodinámicos así como gravitatorios, lo que determina la acumulación de las secreciones producidas como consecuencia de la infección, en las áreas de mayor declive del pulmón. Los lóbulos derechos suelen estar más afectados, esto debido a que el lóbulo apical derecho recibe aire del "bronquio accesorio" (llamado también lobar, apical o derecho), que proviene directamente de la tráquea, pero cuando el proceso tiende a ser más extendido, se encuentran afectados tanto derechos como izquierdos. En los estadios tempranos y medios de la enfermedad se puede encontrar la presencia de exudado catarral en las vías aéreas. (Wolley, *et al.*; 2012).

Mycoplasma hyopneumoniae puede causar en raras ocasiones pleuritis serofibrinosa o fibrinosa que tienden a formar adherencias entre lóbulos y la pared costal. Los nódulos linfoides, bronquial y mediastínicos presentan una linfadenopatía hiperplásica inespecífica caracterizada por un aumento de tamaño, hiperemia y edematización (Maes D., *et al.*, 2008).

Las bronconeumonías exudativas o neumonía lobar severa, especialmente con necrosis o formación de abscesos, sugieren infecciones bacterianas secundarias (Strasser M., *et al.*, 1992).

1.11.6 Lesiones microscópicas.

Microscópicamente, en las lesiones tempranas se observa una neumonía alvéolo intersticial con acúmulos de células mononucleares en tejido perivascular, peribronquial y peribronquiolar, pudiéndose observar también neutrófilos en la luz y alrededor de las vías aéreas, así como en los alvéolos (Ross R., 1999).

Cuando la enfermedad se vuelve crónica, histológicamente se observa una neumonía broncointersticial catarral, se aprecian los característicos folículos linfoides perivasculares y peribronquiales del Tejido Linfoide Asociado a los Bronquios (TLAB). En los casos más graves el TLAB, los linfocitos B y macrófagos principalmente forman centros germinales, que hace prominencia sobre la capa muscular de la mucosa y ocasionan un estrechamiento de la luz de los bronquiolos (Livingston C., *et al.*, 1972). En el epitelio de las vías aéreas se observa pérdida de cilios y exfoliación de células ciliadas; existe hiperplasia de células caliciformes y glándulas submucosas de bronquios y bronquiolos (Fano, 2005). La pared de los alvéolos afectados presenta una hiperplasia de neumocitos tipo II que reemplazan a los neumocitos tipo I. (Maes D., *et al.*, 2008).

El incremento en el número de células secretoras de moco es el responsable, en parte, de la presencia de gran cantidad de exudado mucopurulento en las vías

aéreas. El otro componente de la neumonía broncointersticial es la alveolitis, que se observa especialmente alrededor de las vías aéreas, con un engrosamiento de los septos interalveolares causado por la presencia de linfocitos de variado tamaño y escaso número de células plasmáticas; y en la luz de los alvéolos, se observa la presencia de exudado, compuesto fundamentalmente por macrófagos y escaso número de células plasmáticas, linfocitos y neutrófilos (Thacker E., 2004).

En las lesiones en proceso de recuperación se observan alvéolos colapsados, enfisema alveolar y folículos linfoides (Ross R., 1999).

1.12 *Mycoplasma hyorhinis*

Se encuentra de manera natural en el tracto respiratorio superior, al igual que todas las bacterias del género, presenta un tamaño de genoma relativamente pequeño, variando entre 829 y 839 kb (Kornspan J., *et al.*, 2011), con un contenido en G-C de 25.9%.

Para su aislamiento, son necesarios 3 a 4 días, pero en cultivos bien adaptados crecen en 1 o 2 días. En medio semisólido las colonias se aprecian entre 2 a 5 días, midiendo 0.5-1 mm y poseen la morfología típica de “huevo frito” (Kornspan J., *et al.*, 2011).

Bioquímicamente fermenta la glucosa, no utiliza arginina y no hidroliza la urea, reduce tetrazolio, tanto de forma aeróbica como anaeróbica, es fosfatasa positivo y negativo en la prueba de digestión de la caseína (Friis N., 1971).

1.12.1 Variabilidad antigénica

Mycoplasma hyorhinis presenta uno de los mecanismos de variabilidad antigénica más estudiados. Este sistema, está compuesto por siete genes que codifican para el mismo número de lipoproteínas variables de membrana (vlp), permite a este microorganismo expresar diferentes combinaciones proteicas en función de respuesta inmune del hospedador (Citti C., *et al.*, 2000). Este grupo de proteínas, presentes en la superficie celular, se encuentran reguladas, al igual que en otros micoplasmas, por cambios en su tamaño, y constituyen el componente antigénico principal de *Mycoplasma hyorhinis*.

1.12.2 Transmisión

La transmisión se produce generalmente por contacto directo entre madres o cerdos adultos y lechones justo después del nacimiento (Kobisch M. y Friis N., 1996).

1.12.3 Presentación clínica

Esta bacteria produce septicemia dando lugar a las características lesiones serofibrinosas afectando pleura, peritoneo y pericardio, además de procesos artríticos; es aislado en gran medida a partir de muestras procedentes de oído medio, donde su presencia se ha asociado a cuadros clínicos de otitis en animales de hasta dos meses de edad (Morita T., *et al.*, 1995).

En condiciones naturales, los cuadros de neumonía causados por *Mycoplasma hyorhinis* se asimilan a los observados en casos de NEP, pudiendo apreciarse

una bronconeumonía catarral crónica de distribución craneo ventral, afectando principalmente a los lóbulos apicales, cardíacos e intermedio y la porción craneal de los lóbulos diafragmáticos. En los casos de poliserositis, la enfermedad se presenta normalmente en animales de tres a diez semanas de edad, y de forma ocasional en animales adultos, apareciendo entre tres y diez días tras la exposición a *Mycoplasma hyorhinis* (Clavijo M. *et al.*; 2012).

Los principales signos clínicos incluyen fiebre moderada (40°C - 40.6°C), cojera, inapetencia, dificultad para moverse, artritis y dificultad respiratoria. Entre tres y seis meses tras el inicio de la infección se observa una reducción en los procesos inflamatorios articulares (Sibila M., *et al.*; 2015).

Cabe destacar la existencia de cepas citopatogénicas no cultivables de *Mycoplasma hyorhinis* en casos de abortos recurrentes asociados a su vez con disminución del número de hembras gestantes y un ligero aumento en la mortalidad de cerdas primíparas (Shin J., *et al.*, 2003).

1.12.4 Lesiones

Macroscópicamente se observan lesiones neumónicas de consolidación con distribución craneal, pericarditis y peritonitis fibrinosa con abundante exudado. Desde el punto de vista histológico, las lesiones son semejantes a las presentadas en casos de NEP, incluyendo edema alveolar, hiperplasia bronquial y acúmulo perivascular y peribronquiolar de células mononucleares, además de la presentación de folículos linfoides perivasculares y peribronquiales (Clavijo M. *et al.*; 2012).

1.13 *Mycoplasma hyosynoviae*

En medio semisólido, *Mycoplasma hyosynoviae* da lugar a colonias típicas en forma de “huevo frito”. Bioquímicamente se caracteriza por metabolizar arginina y ser negativo para las pruebas de metabolización de la urea, fermentación de la glucosa y reducción del tetrazolio. Es un micoplasma de crecimiento rápido, especialmente en medios de cultivo enriquecidos con mucina porcina (Kobisch M. y Friis N., 1996).

Mycoplasma hyosynoviae se encuentra en el aparato respiratorio superior del cerdo, principalmente en el área de la tonsila. A partir de esta localización, y de forma septicémica, el organismo es capaz de alcanzar las membranas serosas, tracto respiratorio con una frecuencia del 10% y tiene una especial predilección por las membranas sinoviales (Hagedorn-Olsen T., *et al.*, 1999), aunque otras membranas serosas, como por ejemplo la membrana pericárdica, pueden verse afectadas.

1.13.1 Transmisión

La transmisión se da por contacto directo entre animales, los lechones pueden infectarse de sus madres después de aproximadamente cuatro a seis semanas de vida, pero rara vez durante las primeras (Gomes J., *et al.*, 2012).

1.13.2 Presentación clínica

Dentro de los 2 primeros días de la infección por *Mycoplasma hyosynoviae*, ocurre la bacteriemia y puede persistir en la circulación hasta 8 – 10 días antes de su diseminación a las articulaciones. Clínicamente, se caracteriza por la producción de artritis no purulenta asociada a cojera de moderada a severa, principalmente en miembros posteriores. La susceptibilidad a la enfermedad se localiza entre las 10 y 20 semanas de edad, siendo rara su presentación en animales adultos (Kobisch M. y Friis N., 1996).

Los signos clínicos más claros incluyen la dificultad de movimiento, rigidez, cojera y animales que permanecen recostados o en posición de perro sentado, mostrándose renuentes al movimiento (Ross R. y Duncan J., 1970). Normalmente no se presenta aumento de la temperatura ni disminución del apetito. Los casos de artritis rara vez terminan en una presentación clínica crónica, observándose una recuperación entre una y dos semanas tras el inicio de la cojera (Hagedorn – Olsen T., *et al.*, 1999). En el tracto respiratorio no se han descrito signos clínicos provocados por *Mycoplasma hyosynoviae*.

La tasa de morbilidad varía entre 1 a 50% con baja tasa de mortalidad. Los cerdos afectados son usualmente dañados por sus compañeros de corral o tienen infecciones secundarias (Gomes J., *et al.*, 2012).

1.13.3 Lesiones

Las lesiones macroscópicas causadas por *Mycoplasma hyosynoviae* pueden ocurrir en una o varias articulaciones. Frecuentemente, las lesiones se encuentran en la articulación superior del hombro, del codo, esternón y del corvejón (Dewey C., 1999). En casos agudos se incrementa el fluido sinovial y se torna serosanguinolento y la articulación aumenta de tamaño.

Microscópicamente puede observarse; hiperplasia e hipertrofia de la membrana sinovial más prominente y erosión del cartílago articular. No obstante, el daño al cartílago articular es usualmente encontrado en casos de osteoartritis y puede no ocurrir bajo la capa subcartilaginosa (Ross R., 1999). En cuanto a lesiones respiratorias, no se han descrito.

1.14 Diagnóstico de la micoplasmosis

El diagnóstico microbiológico de la micoplasmosis se ve limitado por el difícil crecimiento de estos microorganismos y la escasez de medios de cultivo comerciales. Sin embargo, gracias a los avances en los métodos de diagnóstico se ha propiciado un aumento en su detección y con ello, su apreciación en la importancia clínica, para ello se utilizan técnicas bacteriológicas, serológicas y moleculares (Muñoz M., 2019).

1.14.1 Bacteriología

Las técnicas bacteriológicas se basan en el aislamiento del microorganismo en laboratorios especializados, las muestras biológicas sospechosas de contener micoplasmas deben ser remitidas en condiciones de humedad y en refrigeración, además de ser procesadas inmediatamente para una óptima recuperación, debido a que las micoplasmas presentan un crecimiento complicado, se debe tener especial cuidado para minimizar la pérdida de microorganismos viables (Kleven S., 2004).

1.14.2 Serología

Las técnicas serológicas son formas de detección indirecta por medio de la identificación de anticuerpos específicos en el suero, a través de una reacción antígeno-anticuerpo, con pruebas como la fijación del complemento, hemoaglutinación indirecta, inhibición del crecimiento, inhibición del metabolismo, ELISA, inmunofluorescencia e inmunohistoquímica (Sibila M., *et al.*, 2010).

1.14.3 Biología molecular

Durante los últimos años, los estudios moleculares han ofrecido alternativas de diagnóstico de laboratorio de algunos microorganismos con dificultad para ser identificados tal como sucede con los micoplasmas. La técnica de reacción en cadena de la polimerasa punto final (PCR) ha demostrado ser una técnica altamente específica, sensible y rápida, pues se fundamenta en la amplificación

de miles de cadenas de ADN a partir de una cadena molde específica *in vitro*, utilizando pequeñas cantidades de ADN de las bacterias presentes en las muestras clínicas (Tamay de Dios L. e Ibarra C., 2013).

Entre las secuencias genéticas más utilizadas en bacterias, se encuentran las proteínas de membrana y los genes ribosomales de la ARN ribosomal 16S y 23S, algunas de las razones por las que se utilizan son que presentan secuencias altamente conservadas y de alta especificidad en algunas regiones que facilitan el desarrollo de iniciadores para la identificación bacteriana (Galván R., 2011; Jan J. y Le Borgne S., 2001).

2. JUSTIFICACIÓN

El diagnóstico de la micoplasmosis porcina en la mayoría de las ocasiones, se realiza observando la signología clínica de los animales a nivel de granja, así como de lesiones macroscópicas de órganos (Armstrong C., 1982). Para obtener un diagnóstico definitivo de la enfermedad, se tiene que integrar diferentes elementos como la historia clínica, signos clínicos, lesiones macroscópicas y microscópicas, así como la identificación del agente etiológico involucrado.

Una de las herramientas de diagnóstico más utilizadas en la micoplasmosis son las pruebas serológicas, en donde solamente se puede cuantificar anticuerpos específicos contra el agente causal; éstas pruebas presentan la limitación de no poder confirmar la presencia de *Mycoplasma spp.*

La identificación bacteriológica del agente etiológico es la prueba de oro para establecer la presencia del microorganismo en la enfermedad, se puede realizar la identidad de género *Mycoplasma spp.* y de la especie, así como su patogenicidad, y la sensibilidad a antimicrobianos.

El diagnóstico del agente etiológico es tardado, debido a que el aislamiento del microorganismo es complicado ya que la bacteria tiene una alta exigencia nutricional y requiere de medios enriquecidos, así como de un periodo de incubación prolongado de 4 a 6 semanas, enriquecimiento semanal del cultivo para promover el desarrollo bacteriano, con el riesgo de contaminación por hongos y bacterias, (Valladares J., 2002).

Por todo lo anterior, es importante reducir los tiempos de laboratorio para realizar un diagnóstico rápido y confiable de la micoplasmosis. Este trabajo pretende promover el crecimiento bacteriano *in vitro*, considerando nutrientes, diluciones, temperatura y tiempo de incubación, para permitir su desarrollo exponencial e identificar con la PCR a *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyosynoviae* y *Mycoplasma hyorhinis*, involucrados en el complejo respiratorio porcino.

3. HIPÓTESIS

Si al procesar muestras clínicas para la tipificación de micoplasmas se realizan diluciones del medio de cultivo inicial, se obtendrá una mejor adaptación de los microorganismos *in vitro*, mejorando así el resultado de identificación de las especies asociadas al complejo respiratorio porcino, con la técnica de PCR.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la adaptación y desarrollo de micoplasmas provenientes de muestras clínicas en el medio de cultivo de Friis, modificando los tiempos de incubación y el volumen de cultivo bacteriano, con la finalidad de identificar con la PCR, las especies asociadas al complejo respiratorio porcino en menor tiempo.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener muestras de pulmones con lesiones craneoventrales de cerdos sacrificados en rastro e hisopos nasales de cerdos con signología de enfermedad respiratoria, para su procesamiento bacteriológico.
- Determinar la curva de crecimiento bacteriano de las cepas de referencia: *Mycoplasma hyopneumoniae* ATCC 25617, *Mycoplasma hyosynoviae* donada por la Universidad de Aarhus Dinamarca y *Mycoplasma hyorhinis* ATCC 23234.
- Promover el desarrollo de micoplasmas presentes en los pulmones e hisopos nasales, modificando el factor de dilución, enriquecimiento y tiempos de incubación.
- Obtener el ADN de los micoplasmas desarrollados en las diferentes diluciones de las muestras clínicas y cepas de referencia.

- Obtener los productos de amplificación de las diferentes especies de micoplasmas asociados al complejo respiratorio porcino y determinar el tiempo de incubación, con la secuencia de la ARN ribosomal 16S reportadas en el GenBank de *Mycoplasma hyopneumoniae* (E02783.1), *Mycoplasma hyosynoviae* (GU227380.1) y *Mycoplasma hyorhinis* (NR_029183.1),

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Muestras

Las muestras de pulmones e hisopos nasales de cerdos se colectaron en el Estado de México y Jalisco, realizando un muestreo aleatorio por conveniencia, obteniendo un total de 110 muestras: 63 pulmones provenientes de cerdos sacrificados en rastro y 47 hisopos nasales de cerdos con problemas respiratorios de una unidad de producción porcina (**Cuadro 4**).

| Cuadro 4. Número de muestras por zona de estudio. | | | |
|--|--------------|------------------------|---------------------|
| Lugar de procedencia | Total | Tipo de muestra | |
| | | Pulmón | Hisopo nasal |
| Rastro Estado de Jalisco | 18 | 18 | 0 |
| Rastro Estado de México | 45 | 45 | 0 |
| Granja Estado de México | 47 | 0 | 47 |
| Total | 110 | 63 | 47 |

5.1.1 Recolección de muestras de pulmones

Las muestras de pulmón fueron recolectadas inmediatamente después del sacrificio a partir de cerdos en etapa de finalización. Todas las muestras presentaban lesiones macroscópicas características de micoplasmosis (Paz Y., 2011), descritas como áreas de consolidación color grisáceo de consistencia firme, bien delimitadas del tejido sano, ubicadas en lóbulos craneales (apicales) o medio (cardíacos); fueron transportadas a temperatura de refrigeración (4°C) en bolsas de plástico herméticas, estériles y rotuladas, para su posterior almacenamiento en congelación (-20°C).

5.1.2 Recolección de muestras de hisopo nasal

Se realizaron 2 muestreos para la recolección de hisopos nasales con un intervalo de 2 años, el primero fue en el 2017 donde se obtuvieron 25 muestras y el segundo se realizó en el 2019 obteniendo 22 muestras, ambos muestreos se realizaron de cerdos de la misma granja en etapas de destete y crecimiento, que presentaban signos clínicos de enfermedad respiratoria como tos y secreciones nasales, se desconoce el calendario de vacunación y la aplicación de tratamientos en los animales.

Para el muestreo, se introdujo un hisopo de plástico estéril en ambos ollares realizando movimientos circulares y de arrastre sobre la mucosa, procurando no tocar el exterior para evitar contaminación. Posteriormente, el hisopo con la muestra se colocó en 2 ml de medio de cultivo de Friis (Anexo) para su transporte.

Todas las muestras se transportaron a temperatura de refrigeración (4°C) y se almacenaron en congelación (-20°C) hasta su procesamiento.

5.2 Cepas de referencia.

Como controles positivos se utilizaron las cepas de referencia: *Mycoplasma hyopneumoniae* ATCC 25617, *Mycoplasma hyosynoviae* donada por la Universidad de Aarhus Dinamarca y *Mycoplasma hyorhinis* ATCC 23234.

5.3 Curva de crecimiento (viabilidad)

Se realizó la curva de crecimiento de los tres microorganismos a partir de las cepas de referencia, utilizando el medio de cultivo líquido y semisólido de Friis para obtener los tiempos de las fases de adaptación, multiplicación, meseta y muerte bacteriana.

El medio líquido promovió la viabilidad y la multiplicación bacteriana, mientras que el medio semisólido se utilizó para realizar el conteo de colonias bacterianas según la etapa de la curva de crecimiento en la que se encontraran.

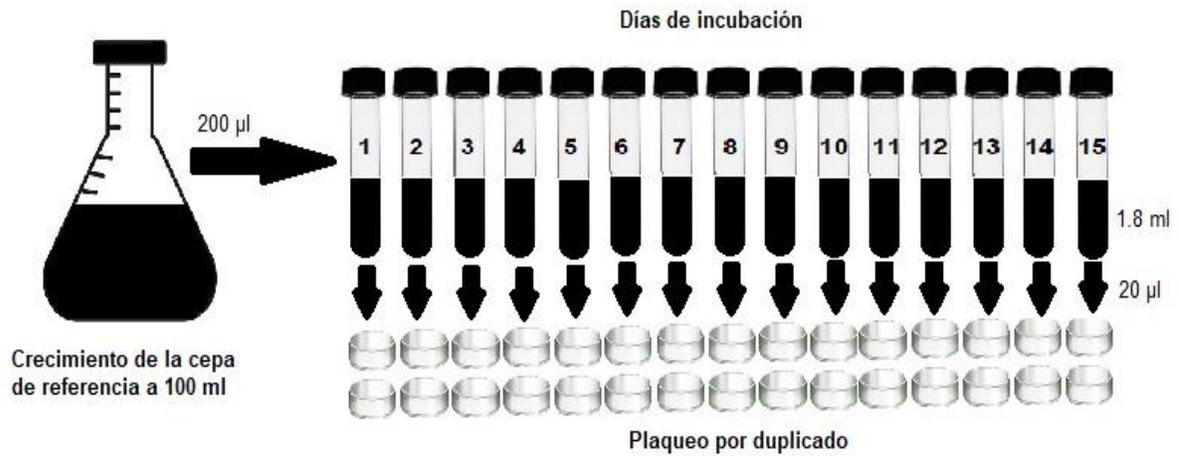
Primero se realizó un incremento en la densidad de micoplasmas de las cepas de referencia (*Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyosynoviae* y *Mycoplasma hyorhinis*), según lo indicado por la metodología de Tully en 1983, donde se tomaron 200 µl de las cepas de referencia para inocularlas y homogeneizarlas en 1.8 ml de medio líquido de Friis y después incubarlas a 37 °C en aerobiosis. Al observar cambio de pH y turbidez, se fue aumentado el volumen

agregando medio de cultivo a cada cepa, colocando el doble de su volumen inicial para su enriquecimiento, evento que se repitió 6 veces hasta los 30 días de incubación, llegando a un volumen final de 100 ml. Finalmente para verificar la viabilidad de los microorganismos crecidos, se realizó la siembra de 20 μ l en medio semisólido de Friis y se observó el desarrollo de colonias de micoplasmas en un microscopio estereoscópico a 3.5 X.

Posteriormente para cada cepa, se prepararon 15 tubos con 1.8 ml de medio líquido de Friis (con la finalidad de disminuir la probabilidad de contaminación) y se inocularon 200 μ l de los 100 ml obtenidos anteriormente, a cada uno. Todos los tubos fueron identificados con números sucesivos del 1 al 15 indicando el tiempo de incubación en días, se incubaron a 37°C en aerobiosis y fueron evaluados diariamente con el fin de detectar cambio de pH o turbidez (**Figura 1**).

Por cada día de incubación se realizó el pase a medio semisólido de Friis, para ello se tomaron 20 μ l y se hizo un plaqueo por duplicado, se incubaron en microaerobiosis a 37°C por 7 días y posteriormente se observaron en un microscopio estereoscópico para realizar el conteo visual de colonias desarrolladas, obteniendo una media diaria y para obtener la cantidad aproximada de UFC/ml por día, el total se multiplicó por 50.

Figura 1. Método para la curva de crecimiento de las tres cepas de referencia.

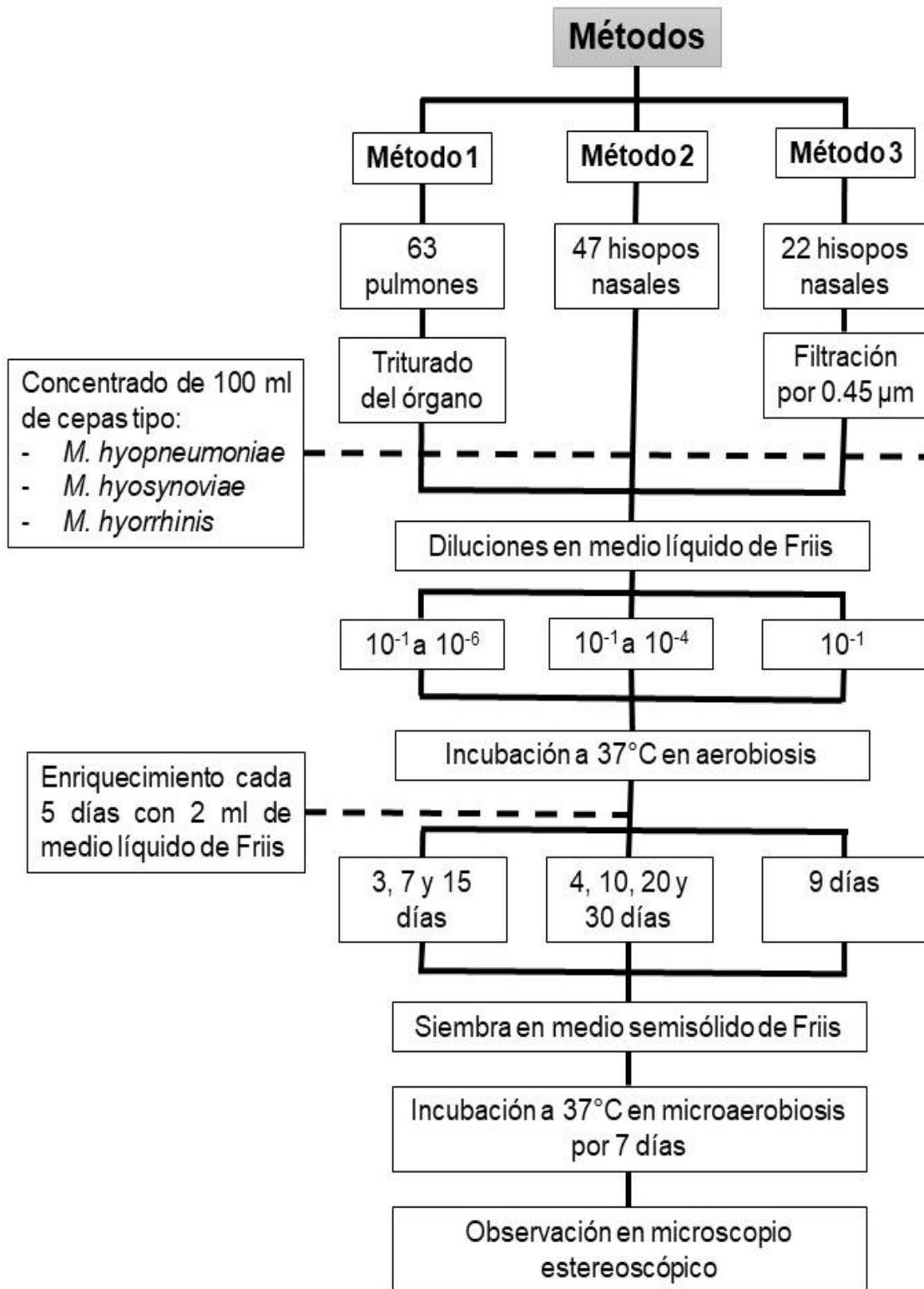


Con lo anterior se determinó el tiempo de cada una de las fases en la curva de crecimiento para los tres diferentes microorganismos.

5.4 Procesamiento de las muestras clínicas.

Para el procesamiento de las muestras clínicas se utilizaron 3 métodos (**Figura 2**), los métodos 1 y 2 fueron tomados con base a los criterios de cultivo *in vitro* descritos por Goodwin R., 1972 y el método 3 se realizó a partir de los resultados obtenidos de las curvas de crecimiento. En cada método se incluyeron como controles positivos a las tres cepas de referencia: *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyosynoviae* y *Mycoplasma hyorhinis*.

Figura 2. Métodos para el procesamiento de las muestras clínicas.



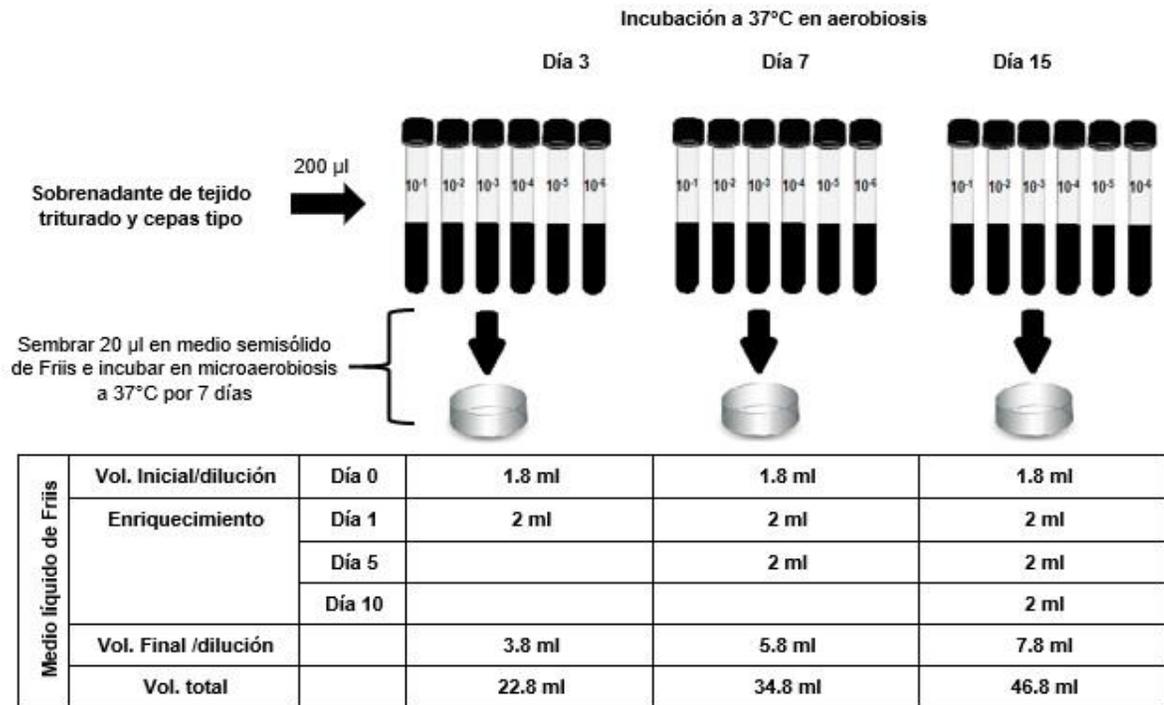
5.4.1 Método 1: Procesamiento de las muestras de pulmón

Para el cultivo de las muestras de pulmón y con el fin de promover el desarrollo bacteriano y diluir factores de contaminación, se utilizó el medio líquido de Friis y se realizaron diluciones decuples seriadas 10^{-1} a 10^{-6} , las cuales fueron incubadas a 37°C durante 15 días, en este período se hicieron lecturas los días 3, 7 y 15. Realizando diluciones para cada una de las lecturas (**Figura 3**).

1. Las 63 muestras de pulmón fueron descongeladas y procesadas dentro del gabinete de bioseguridad, se quemó la superficie del órgano con una espátula caliente y debajo del área quemada, se tomó aproximadamente 2 cm^3 de tejido que fue triturado con medio líquido de Friis y arena estéril para liberar los microorganismos adheridos, en un volumen de $600\ \mu\text{l}$ (Kleven S., 2004).
2. Se tomaron $200\ \mu\text{l}$ de sobrenadante del tejido triturado que fue depositado en 1.8 ml de medio líquido de Friis, para realizar diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-6} , en el día 3 y lo mismo para los días 7 y 15.
3. De cada una de las cepas de referencia utilizadas como controles positivos (*Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyosynoviae* y *Mycoplasma hyorhinis*) cultivadas en el medio de Friis de un concentrado de 100 ml de 30 días de crecimiento, se tomaron $200\ \mu\text{l}$ y se realizaron diluciones decuples seriadas 10^{-1} a 10^{-6} en el medio líquido de Friis para los días 3, 7 y 15 de incubación.
4. Todas las diluciones fueron incubadas en aerobiosis a 37°C .

5. Se les añadió 2 ml de medio líquido de Friis fresco, a todas las diluciones de las muestras y cepas de referencia, los días uno, cinco y diez de incubación.
6. Se mezclaron los 6 tubos de las diluciones del día 3 de incubación, para ser concentrados posteriormente, obteniendo un volumen final de 22.8 ml. El mismo procedimiento se realizó para los diferentes días de incubación obteniendo volúmenes de 34.8 y 46.8 ml para los días 7 y 15 respectivamente **(Figura 3)**.
7. Para permitir el desarrollo de colonias típicas de micoplasmas, se realizó la siembra de 20 µl de la dilución 10^{-3} de los diferentes tiempos de incubación en medio semisólido de Friis, y se incubaron en microaerobiosis a 37°C durante 7 días, para su posterior observación en microscopio estereoscópico. Ya que, en estudios realizados anteriormente por López G.; 2020, con las cepas de referencia, se observaron morfologías definidas, similares a *Mycoplasma spp.* a partir de esta dilución (10^{-3}).

Figura 3. Método 1 para el procesamiento de muestras de pulmón incubadas en 3, 7 y 15 días.



5.4.2 Método 2: Procesamiento de las muestras de hisopo nasal

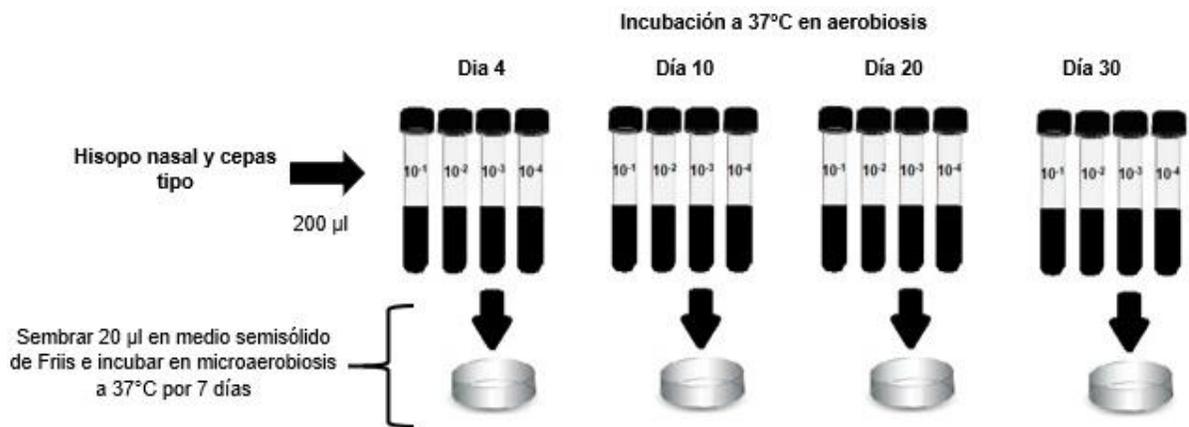
Para el cultivo de las muestras de hisopo nasal y con el fin de promover el desarrollo bacteriano y reducir la cantidad de factores contaminantes, se utilizó el medio de Friis y se realizaron diluciones decuples seriadas de 10^{-1} a 10^{-4} , las cuales fueron incubadas a 37°C durante 30 días, en este período se hicieron lecturas los días 4, 10, 20 y 30. Las diluciones se realizaron por cuadruplicado (Figura 4).

1. Se descongelaron cada una de las 47 muestras de hisopo nasal contenidas en 2 ml de medio líquido de Friis.

2. Se tomaron 200 µl del medio de cultivo líquido de Friis utilizado como medio de transporte y se transfirieron a 1.8 ml (10^{-1}) de medio de Friis líquido fresco. A partir de la dilución 10^{-1} se realizaron diluciones decuples seriadas hasta 10^{-4} en el día 4 y lo mismo para los días 10, 20 y 30 de incubación (**Figura 4**).
3. Los controles positivos que se utilizaron para este método fueron las cepas de referencia *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyosynoviae* y *Mycoplasma hyorhinis*, fueron también cultivadas en el medio de Friis, de un concentrado de 100 ml de 30 días de crecimiento, se tomaron 200 µl y se realizaron diluciones decuples seriadas 10^{-1} a 10^{-4} en el medio líquido de Friis para los días 4, 10, 20 y 30 de incubación.
4. Todas las diluciones fueron incubadas en aerobiosis a 37°C.
5. Se le añadió 2 ml de medio líquido de Friis fresco, a todos los tubos de las diluciones de las muestras y de las cepas de referencia, el día uno, cinco, diez, quince, veinte y veinticinco de incubación, obteniendo diferentes volúmenes de crecimiento bacteriano como se indica en la **Figura 4**.
6. Se mezclaron los 4 tubos de diluciones del día 4 de incubación para ser concentrados y posteriormente obtener un volumen final de 15.2 ml. El mismo procedimiento se realizó para los diferentes días de estudio obteniendo 23.2, 39.2 y 55.2 ml para los días 10, 20 y 30 de incubación, respectivamente (**Figura 4**).
7. Para permitir el desarrollo de colonias típicas de micoplasmas, se sembraron 20 µl de las diluciones 10^{-3} de los diferentes tiempos de

incubación en medio semisólido de Friis, las placas petri inoculadas se incubaron en microaerobiosis a 37°C durante 7 días para su posterior observación en el microscopio estereoscópico, para identificar el crecimiento de formas similares a *Mycoplasma spp.*

Figura 4. Método 2 para el procesamiento de muestras de hisopo nasal incubadas en 4, 10, 20 y 30 días.



| Medio líquido de Friis | Vol. Inicial/dilución | Día 0 | 1.8 ml | 1.8 ml | 1.8 ml | 1.8 ml |
|------------------------|-----------------------|-------|---------|---------|---------|---------|
| | Enriquecimiento | Día 1 | 2 ml | 2 ml | 2 ml | 2 ml |
| Día 5 | | | | 2 ml | 2 ml | 2 ml |
| Día 10 | | | | | 2 ml | 2 ml |
| Día 15 | | | | | 2 ml | 2 ml |
| Día 20 | | | | | | 2 ml |
| Día 25 | | | | | | 2 ml |
| | Vol. Final /dilución | | 3.8 ml | 5.8 ml | 9.8 ml | 13.8 ml |
| | Vol. total | | 15.2 ml | 23.2 ml | 39.2 ml | 55.2 ml |

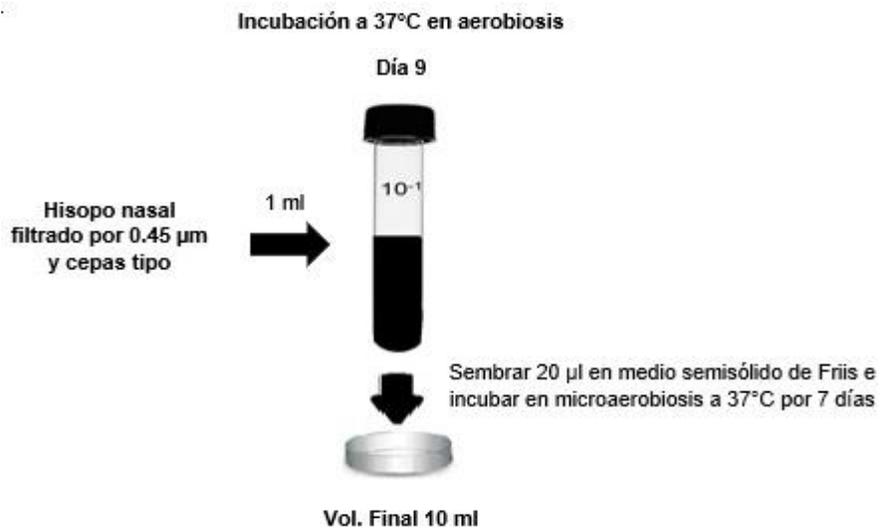
5.4.3 Método 3: Procesamiento de las muestras filtradas de hisopo nasal

De acuerdo a los resultados obtenidos en la curva de crecimiento realizada a las cepas de referencia (*Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyosynoviae* y *Mycoplasma hyorhinis*), se estableció el tiempo de incubación de las muestras, para permitir el desarrollo de los micoplasmas. Además, se filtró por membranas de nitrocelulosa de 0.45 µm de límite de paso, para evitar agentes bacterianos contaminantes que pudieran competir por los nutrientes y permitir el desarrollo en el medio de cultivo de los micoplasmas presentes en la muestra. Para este método solo se realizó una dilución 10^{-1} con un tiempo de incubación de 9 días a 37°C y sin realizar enriquecimiento (**Figura 5**).

1. Se procesaron 22 muestras de hisopo nasal, obtenidas en el año 2019 durante el segundo muestreo en granja. Las muestras fueron descongeladas y tomando 1 ml del medio líquido de Friis utilizado como medio de transporte que fue filtrado con una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm estéril.
2. El volumen obtenido de la filtración (1 ml), se depositó en 9 ml de medio líquido de Friis (10^{-1}) y se incubó a 37°C en aerobiosis por 9 días.
3. Las cepas control (*Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyosynoviae* y *Mycoplasma hyorhinis*) fueron cultivadas en 100 ml de medio líquido de Friis por 30 días y se tomó 1 ml, depositándolo en 9 ml de medio de Friis, realizando una dilución 10^{-1} .
4. Todas las diluciones fueron incubadas en aerobiosis a 37°C por 9 días.

5. Se concentró cada dilución (10^{-1}), con un volumen final de 10 ml (**Figura 5**).
6. Para permitir el desarrollo de colonias típicas de micoplasmas, se sembraron 20 μ l de las diluciones en medio semisólido de Friis y se incubaron a 37°C en microaerobiosis durante 7 días, para su posterior observación en el microscopio estereoscópico y verificar la presencia de morfologías similares a *Mycoplasma spp.*

Figura 5. Método 3 para el procesamiento de muestras de hisopo nasal a los 9 días de incubación.



5.5 Concentrado de las diluciones.

El volumen final obtenido de las diluciones en los diferentes métodos (1, 2 y 3), se centrifugó a 8,000 rpm por 45 minutos para concentrar los microorganismos desarrollados en las muestras y los controles positivos, obteniendo un pellet que fue lavado tres veces con 1 ml de una solución buffer de fosfatos (PBS) estéril, con un pH de 7.2 y se conservó a -20°C, hasta la extracción de ADN (Tully J., 1983).

5.6 Extracción de ADN.

La extracción y purificación de ADN, se realizó con el protocolo de Tiocianato de Guanidina (Sambrook J. y Rusell D., 2001).

Para desarrollar esta técnica, se descongeló el pellet conservado en PBS, centrifugando¹ a 12,000 rpm por 15 minutos y se descartó el sobrenadante.

1. Se agregaron 250 µl de solución de lisis (Tiocianato de Guanidina 5M, N-Sarcocil 0.5% y EDTA 0.1M), a la pastilla bacteriana, para después homogeneizar e incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos
2. Se adicionaron 125 µl de Acetato de amonio 7.4 M, invirtiendo el tubo de 5 a 6 veces y se incubó a 4°C, durante 10 minutos.
3. Posteriormente, se agregaron 250 µl de Cloroformo- alcohol- isoamílico 24:1, se homogeneizo y centrifugó a 12,000 rpm por 15 minutos, lo que provocó la separación de ácidos nucleicos en una solución acuosa en la superficie del tubo, restos celulares en el centro y la sedimentación de sales utilizadas con anterioridad en el fondo (este paso fue realizado 2 veces).
4. Se separó la fase acuosa y se agregaron 500 µl de Etanol absoluto, se homogeneizó y centrifugó a 12,000 rpm por 15 minutos y posteriormente se desechó el sobrenadante.

¹ Modelo HERMLE Z300, Marca Labnet

5. Se añadió 1 ml de Etanol al 70%, homogeneizando y centrifugando a 12,000 rpm por 15 minutos.
6. Finalmente, se dejó secar a temperatura ambiente por aproximadamente 12 horas y el ADN se conservó en congelación (-20°C) hasta su uso.

5.7 Cuantificación de ADN

5.7.1 Cepas de referencia

El ADN proveniente de un crecimiento de 100 ml de las cepas de referencia (*Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyosynoviae* y *Mycoplasma hyorhinis*), fue hidratado con 100 µl de agua libre de nucleasas. Para determinar la cantidad mínima necesaria de ADN para obtener productos de amplificación, se realizaron diluciones decuples seriadas (10 µl de ADN / 90 µl de agua) de la 10⁰ a 10⁻⁴ y de cada dilución se tomó 2 µl para determinar la cantidad de ADN en un espectrofotómetro² a una OD de 240-260 nm λ y se realizó una PCR utilizando como blanco un fragmento del gen de la ARN ribosomal 16S, para visualizar un producto de amplificación en las diferentes diluciones.

Para *Mycoplasma hyopneumoniae* se utilizaron tres fragmentos traslapados de la región de la ARN ribosomal 16S, denominados como F1, F2 y F3 con un tamaño de 491, 1000 y 588 pares de bases (pb) respectivamente, para *Mycoplasma hyosynoviae* 585 pb y para *Mycoplasma hyorhinis* 1200 pb.

² Genesys 10S Bio, Marca Thermo Scientific™

5.7.2 Muestras clínicas

El ADN obtenido de las diluciones de cada muestra clínica procesada, fue hidratado con 100 μ l de agua libre de nucleasas, del cual se tomaron 2 μ l para realizar su cuantificación por espectrofotometría, calculada a través de una OD de 240-260 nm λ .

5.8 Integridad de ADN por electroforesis.

Se evaluó el ADN por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1%, utilizando 10 μ l del ADN con 2 μ l de buffer de carga (0.2% de azul de bromofenol y 0.2% de Cianol de Xileno) y 5 μ l de marcador de peso molecular Lambda HindIII, de ocho marcajes, comprendidos entre 125 y 23,130 pares de bases. Se utilizaron 95 V por 50 minutos con una solución buffer TAE 1X (TRIS, Ácido acético glacial y EDTA) de 40 ml, posteriormente el gel fue teñido con Bromuro de etidio 1% por 10 minutos y se observó la integridad del ADN en un fotodocumentador³ para la posterior captura de la imagen.

³ Life technologies, Thermo Fisher Scientific, 4466611 E-gel Imager

5.9 PCR

5.9.1 Iniciadores

Se utilizaron iniciadores diseñados con base en el gen de la ARN ribosomal 16S para las tres especies de micoplasmas (**Cuadro 5**) y con el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST®) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y OligoAnalyzer Tool del IDT, se realizó el análisis *in silico* de las secuencias.

| Cuadro 5. Iniciadores para las diferentes especies de <i>Mycoplasma spp.</i> | | | | |
|---|-----------------------------|---------------------|-----------------------------------|------|
| Especie y clave de acceso | Tamaño | Iniciadores (5´-3´) | | % GC |
| | | Posición | Secuencia | |
| <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> E02783.1 | F1 ^a 491 pb. | Fw (1-22) | CGC AAT CAT GAG AGT TTG ATCC | 45.5 |
| | | Rv 1 (466-491) | GAT AGG AAA TGC TCT AGT CTT GAC G | 44 |
| | F2 ^b 1000 pb. | Fw (205-227) | TTC AAA GGA GCC TTC AAG CTT C | 45.5 |
| | | Rv 2 (1183-1205) | AGA GGC ATG ATG ATT TGA CGT C | 45 |
| | F3 ^a 588 pb. | Fw (879-898) | CCG CCT GAG TAG TAT GCT C | 57.9 |
| | | Rv 3 (1447-1467) | GAG ACC ATT GCC TAA GGC AG | 55 |
| <i>Mycoplasma hyorhinis</i> ^b GU227380.1 | 1129 pb. | Fw (34-56) | CGG GAT GTA GCA ATA CAT TCA G | 45.5 |
| | | Rv 2 (1141-1163) | AGA GGC ATG ATG ATT TGA CGT C | 45 |
| <i>Mycoplasma hyosynoviae</i> ^a NR_029183.1 | 585 pb. | Fw (603-624) | CAG GGC TCA ACC CTG GCT CGC | 71.4 |
| | | Rv 2 (1166-1188) | AGA GGC ATG ATG ATT TGA CGT C | 45 |

a. Miranda-Morales R., Rojas V., *et. al.*; 2019. b. Stakenborg T., *et. al.*; 2006

5.9.1.1 *Mycoplasma hyopneumoniae*

Para *Mycoplasma hyopneumoniae* se utilizaron tres fragmentos traslapados, (F1 y F3) descritos por Miranda-Morales R., Rojas V., *et. al.*; 2019 y F2 por Stakenborg T., *et. al.*; 2006, a partir del ARN ribosomal 16S de la cepa J, los cuales se muestran en diferente color dentro de la secuencia de ADN con número de acceso > E02783.1.

```
1 5'-CGCAATCATGAGAGTTTGATCC TGGCTCAGGATAAACGCTAGCTGTGTGCTTAATACATG
61 CATGTTGAACGGAATATTTTAGTTCGCTAA AATATTTAGTAGCAAATGGGTGAGTAACAC
121 GTACCTAACCTACCTTTTGGACTGGGATAACCATTGGAAACAGTGGCTAATACCAGATAT
181 GATAAAAATTTGCATGAATTTTTA TTCAAAGGAGCCTTCAAGCTTC ACCAAGAAATGGGG
241 GTGCGCAACATTAGTTAGTTGGTAGGGTAAAAGCCTACCAAGACGATGATGTTTAGCGGG
301 GCCAAGAGGTTGTACCGCCACACTGGGATTGAGATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCA
361 GCAGTAAGGA ATATTCCACAATAAGCGAAAGCTTGATGGAGCGACACAGCGTGCAGGATG
421 AAGTCTTTCGGGATGTAAACTGCTGTTGTAAGGGAAGAAAAAACTA GATAGGAAATGCTC
481 TAGTCTTGACG GTACCTTATTAGAAAGCGACGGCAAACCTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
541 TACATAGGTCGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTTTTTTGT
601 TAAGTTTAAAGTTAAATGCTAAAGCTCAACTTTAGTCCGCTTTAGATACTGGCAAAATAG
661 AATTATGAAGAGGTTAGCGGAATTCCTAGTGGAGTGGTGAATACGTAGATATTAGGAAG
721 AACACCAATAGGCGAAGGCAGCTAACTGGTCATATATTGACACTAAGGGACGAAAGCGTG
781 GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGATCATTAGTTGG
841 TGGCAAAAGTCACTAACACAGCTAACGCGTTAAATGAT CCGCCTGAGTAGTAGCTC GCA
901 AGAGTGAAACTTAAAGGAATTGACGGGAACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAAT
961 TTGAAGATACGCGTAGAACCTTACCCACTCTTGACATTCTCGCAAAACTATAGAGATATA
1021 GCCGAGGCTAACGAGATCACAGATGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGT
1081 TAGGTTAAGTCTGCAACGAGCGCAACCCTTTTCTTTAGTTGCTAACATTTAGTTGAGAA
1141 CCCTAAAGATACTGCCGGCGCAAGCCGGAGGAAGGTGGGGAC GACGTCAAATCATCATGC
```

1201 CTCTTACGAGTGGGGCAACACACGTGCTACAATGGCTACTACAAAGAGCAGCAAAAACAGT
1261 GATGTCAAGCTAATCTCAAAAAAGTAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTT
1321 CATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCTATACTGCGGTGAATACGTTCTCGG
1381 GTTTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTAATGCCCAAAGTCGGTGAGTTA
1441 ACTTCGAGACCATTGCCTAAGGCAGGACCGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAT
1501 CCCTACGAGAACGTGGGGATGGAACACCTCCTTTCTA -3'

5.9.1.2 *Mycoplasma hyorhinis*

Secuencia parcial del Gen de ARN ribosómico 16S de la cepa USP83T de *Mycoplasma hyorhinis*. Número de acceso > GU227380.1

1 5'- ACGCTCGCTGTGTGCTAATACATGCATGTTGAA CGGGATGTAGCAATACATTCAGTAGCG
61 AATGGGTGAGTAACACGTACCTAACCTACCTTTAAGACTGGGATAACTATTGGAAACAAT
121 AGCTAATACCGGATATAGTTATTTATCGCATGATGAGTAATAGAAAGGAGCTTCACAGCT
181 TCACTTAAAAATGGGGGTGCGGAACATTAGTTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGAC
241 GATGATGTTTAGCCGGGCCGAGAGGCTGTACGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCCAG
301 ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTTCCACAATGAGCGAAAGCTTGATGGAGCGA
361 CACAGCGTGCAGGATGAAGTTCTTCGGAATGTAAACTGCTGTTATAAGGGAAGAAAAAAT
421 AGAATAGGAAATGATTTTATCTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCGACGGCAAACCTATGTG
481 CCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGTCGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCG
541 TCCGTAGGTTTTTTGCTAAGTCTGGAGTTAAATGCTGAAGCTCAACTTCAGTCCGCTTTG
601 GATACTGGCAAATAGAATTATAAAGAGGTTAGCGGAATTCCTAGTGAAGCGGTGGAATG
661 CGTAGATATTAGGAAGAACCAATAGGCGAAGGCAGCTAACTGGTTATATATTGACACT
721 AAGGGACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGGTAAAC
781 GATGATCATTAGTTGGTGAATAATTTCACTAACGCAGCTAACGCGTTAAATGATCCGCC
841 TGAGTAGTATGCTCGCAAGAGTGAACTTAAAGGAATTGACGGGAACCCGCACAAGCGGT
901 GGAGCATGTGGTTTAATTTGAAGCTACGCGTAGAACCTTACCCACTCTTGACATCTTCTG
961 CAAAGCTATAGAGATATAGTGGAGGTTAACAGAATGACAGATGGTGCATGGTTGTCGTC
1021 GCTCGTGTGCTGAGATGTTAGGTTAAGTCCTGCAACGAGCGCAACCCTTTTCTTTAGTTA

1081 CTAATATTAAGTTAAGGACTCTAGAGATACTGCCTGGGTAACCAGGAGGAAGGTGGGGAC
1141 GACGTCAAATCATCATGCCTCTACGAGTGGGGCAACACACGTGCTACAATGGTCGGTAC
1201 AAAGAGAAGCAATATGGTGACATGGAGCAAATCTCAAAAAACCGATCTCAGTTCGGATTG
1261 AAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGCTACGCTA
1321 CGGTGAATACGTTCTCGGGTTTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTAATG
1381 CCCAAAGTCGGTGAGTAACTTCGGAGACCATGCCTAAAGGCAGACTGATGACT -3'

5.9.1.3 *Mycoplasma hyosynoviae*

Secuencia parcial del gen de la ARN ribosomal 16S de *Mycoplasma hyosynoviae*
cepa S-16, secuencia parcial. Número de acceso > NR_029183.1

1 5'-CCGCCAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCTGTGTGCCTAATACATGCATG
61 TCGAGCGGGAGTAGCAATACTCTAGCGGCAAATGGGTGAGTAACACGTGCTTAATCTACC
121 TTTTAGATTGGAATACCCAATGGAAACATTGGTTAATGCCGGATAAGTATGAAATCGCAT
181 GATTCGTTATGAAAGAAGCGTTTGCTTCACTAAGAGATGAGGGTGCCGAACATTAGCTA
241 GTTGGTGAGGTAATGGCCCACCAAGGCTATGATGTTTAGCCGGGTCGAGAGACTGAACGG
301 CCACATTGGGACTGAGATACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATATTCC
361 ACAATGAGCGAAAGCTTGATGGAGCGACACAGCGTGCACGATGAAGGCCCTCGGGTTGTA
421 AAGTGCTGTTGCAAGGGAAGAGAAAGCAGTTGAGGAAATGCAACTGAACTGACGGTACCT
481 TGTTAGAAAGCGATGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGTAATACATAGGTCGCAAGCG
541 TTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTTCGTAGGCTGTTTATTAAGTCTGGAGTCAAAT
601 CC CAGGGCTCAACCCTGGCTCGC TTTGGATACTGGTAACTAGAGTTGGATAGAGGTAAG
661 CGGAATTCCATGTGAAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAAAGGCGAAGG
721 CAGCTTACTGGGTCTATACTGACGCTGAGGGACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG
781 ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGATCATTAGTCGGTGGCCAATCACTGACGCA
841 GCTAACGCATTAATGATCCGCCTGAGTAGTATGCTCGCAAGAGTAAACTTAAAGGAAT
901 TGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTGAGGATACGCGGAGAACC
961 TTACCCACTCTTGACATCCTTCGCAAAGCTATAGAGATATAGTGGAGGTTAACGGAGTGA
1021 CAGATGGTGCATGGTTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTTGGTCAAGTCCTGCAACG

1081 AGCGCAACCCCTATCTTTAGTTACTAACGAGTCATGTGCGAGGACTCTAGAGATACTGCCT
1141 GGGTAACTGGGAGGAAGGTGGGGAT **GACGTCAAATCATCATGCCTCT** TACGAGTGGGGCT
1201 ACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGAGAAGCAATATGGCGACATGGAGCAAATCTC
1261 AAAAAGCCGATCTCAGTTCGGATTGGAGTCTGCAATTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGC
1321 TAGTAATCGTAGATCAGCTTCGCTACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTGTACACACCGCC
1381 CGTCACACCATGGGAGCTGGTAATACCCAAAGTCGGTTTGCTAACCTCGGAGGCAACTGC
1441 CTAAGGTAGGACTGGTGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTATCCCTACCGGGCTAGAG -
 3'

5.10 Reacción de PCR.

Se preparó una reacción de 25 µl para la PCR (White B., 1997), **Cuadro 6.**

| Cuadro 6. Reacción de PCR | | |
|---------------------------|---------------|---------|
| Componente | Concentración | Volumen |
| Iniciador Forward | [10 pmol] | 1 µl |
| Iniciador Reverse | [10 pmol] | 1 µl |
| DNTP's | [10 mM] | 1 µl |
| MgCl ₂ | [50 mM] | 1.75 µl |
| Buffer reacción PCR | 10 x | 2.5 µl |
| ADN muestra | 10 ng/ µl | 10 µl |
| H ₂ O | q.b.p. | 7.5 µl |
| TAQ polimerasa | [5 U/µl] | 0.25 µl |
| Total | | 25 µl |

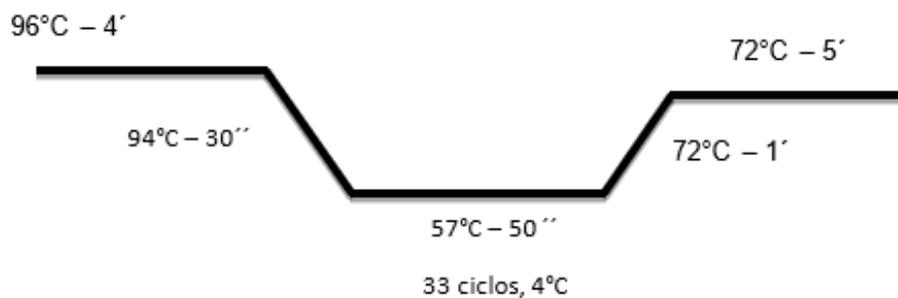
q.b.p. Cuanto baste para

5.11 Condiciones de la PCR.

Para la amplificación de los fragmentos de ADN, se utilizaron las temperaturas, tiempos y números de ciclos en el termociclador⁴, descritas en el **Cuadro 7** y **Figura 6**, para los tres microorganismos.

| Cuadro 7. Condiciones de la PCR | | |
|---------------------------------|------|---------|
| ETAPA | T° | TIEMPO |
| Desnaturalización inicial | 96°C | 4 min. |
| Desnaturalización | 94°C | 30 seg. |
| Alineación | 57°C | 50 seg. |
| Extensión | 72°C | 1 min. |
| Extensión final | 72°C | 5 min. |

Figura 6. Condiciones de temperatura de la PCR



⁴ Termociclador 3Prime TECHNÉ (24 x 0,2 ml)

5.12 Electroforesis para la visualización de productos amplificados por la PCR.

Los productos amplificados por la PCR se analizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% por 50 minutos a 95 V, con 10 µl del producto de PCR, 2 µl del buffer de carga (0.2% de azul de bromofenol y 0.2% de Cianol de Xileno) y 5 µl de Marcador de Peso Molecular 1 Kb plus DNA Ladder, con 20 fragmentos que abarcan de 100 a 12,000 pares de bases y una solución buffer (TAE 1X) de 40 ml. Posteriormente el gel fue teñido con Bromuro de etidio 1% por 10 minutos y el observado en un fotodocumentador⁵ para la captura de la imagen de los productos amplificados.

6. RESULTADOS

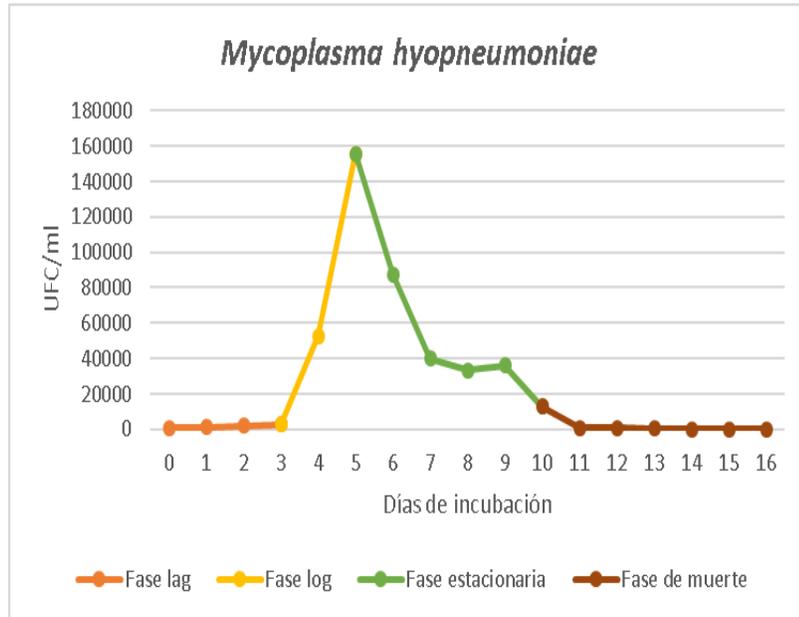
6.1 Curva de crecimiento.

La curva de crecimiento bacteriana de las cepas de referencia, para *Mycoplasma hyopneumoniae* (**Figura 7**), *Mycoplasma hyosynoviae* (**Figura 8**) y *Mycoplasma hyorhinis* (**Figura 9**), en el medio líquido y semisólido de Friis mostraron diferencias en los 15 días de incubación para las distintas etapas de la curva.

⁵ Life technologies Thermo Fisher Scientific

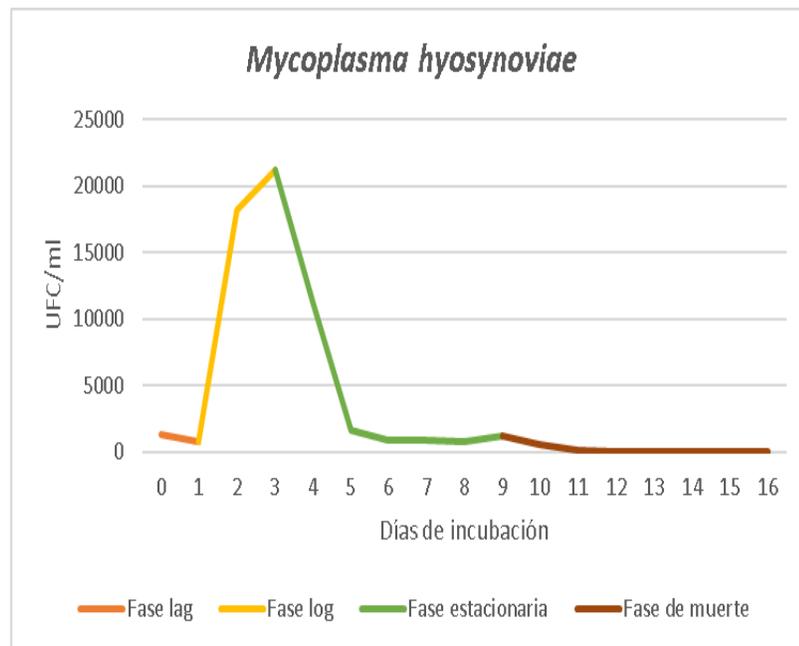
| <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> | |
|--|---------|
| Día de incubación | UFC/ml |
| 0 | 950 |
| 1 | 1,350 |
| 2 | 2,100 |
| 3 | 2,950 |
| 4 | 52,575 |
| 5 | 155,675 |
| 6 | 87,700 |
| 7 | 39,950 |
| 8 | 33,325 |
| 9 | 36,066 |
| 10 | 12,675 |
| 11 | 775 |
| 12 | 700 |
| 13 | 550 |
| 14 | 50 |
| 15 | 0 |

Figura 7. Curva de crecimiento de *Mycoplasma hyopneumoniae* durante 15 días de incubación.



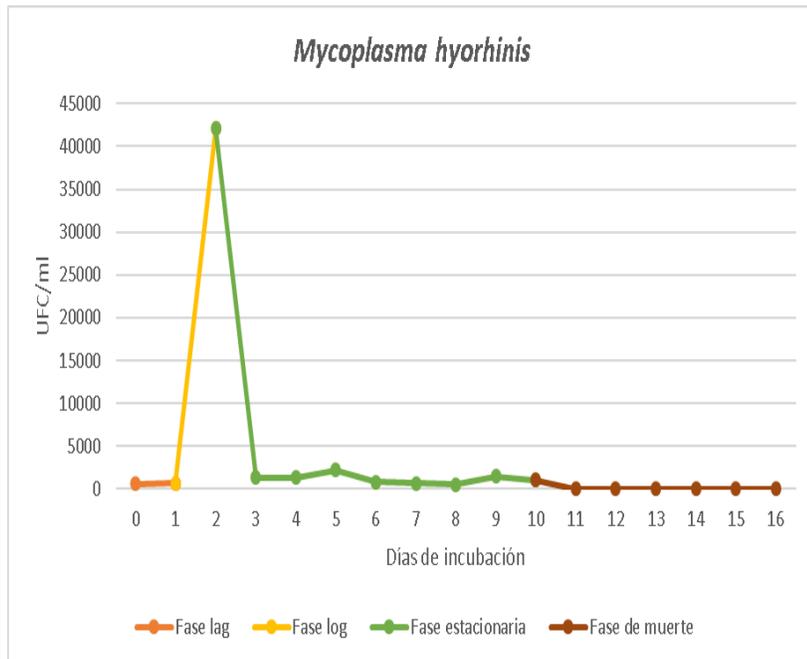
| <i>Mycoplasma hyosynoviae</i> | |
|--------------------------------------|--------|
| Días de incubación | UFC/ml |
| 0 | 1,300 |
| 1 | 750 |
| 2 | 18,200 |
| 3 | 21,200 |
| 4 | 11,375 |
| 5 | 1,675 |
| 6 | 900 |
| 7 | 925 |
| 8 | 750 |
| 9 | 1,217 |
| 10 | 625 |
| 11 | 150 |
| 12 | 25 |
| 13 | 0 |
| 14 | 0 |
| 15 | 0 |

Figura 8. Curva de crecimiento de *Mycoplasma hyosynoviae* durante 15 días de incubación.



| <i>Mycoplasma hyorhinis</i> | |
|------------------------------------|--------|
| Día de incubación | UFC/ml |
| 0 | 600 |
| 1 | 650 |
| 2 | 42,050 |
| 3 | 1,300 |
| 4 | 1,300 |
| 5 | 2,225 |
| 6 | 800 |
| 7 | 700 |
| 8 | 550 |
| 9 | 1,492 |
| 10 | 1,000 |
| 11 | 25 |
| 12 | 0 |
| 13 | 0 |
| 14 | 0 |
| 15 | 0 |

Figura 9.. Curva de crecimiento de *Mycoplasma hyorhinis* durante 15 días de incubación.



En la fase de adaptación (lag) de *Mycoplasma hyopneumoniae* se registró una duración de 3 días y de un día para *Mycoplasma hyosynoviae* y *Mycoplasma hyorhinis*.

En la fase de crecimiento exponencial (log), *Mycoplasma hyopneumoniae* mostró un pico de 1.5×10^5 UFC/ml en el día 5; *Mycoplasma hyosynoviae* alcanzó su pico con 2.1×10^4 de UFC/ml para el día 3; y finalmente, *Mycoplasma hyorhinis* en el día 2 mostró un pico de 4.2×10^5 UFC/ml.

La fase de meseta o fase estacionaria fue del día 7 al 9 para *Mycoplasma hyopneumoniae*, del 5 al 9 para *Mycoplasma hyosynoviae* y del 3 al 4 para *Mycoplasma hyorhinis*.

Por último, el inicio de la fase de muerte se registró casi al mismo tiempo en los tres microorganismos, siendo el día 10 cuando la cantidad de UFC/ml declinó para *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Mycoplasma hyosynoviae*, el día 11 para *Mycoplasma hyorhinis*.

La **Figura 10** muestra el comportamiento de las curvas de crecimiento de las tres especies de micoplasmas analizadas.

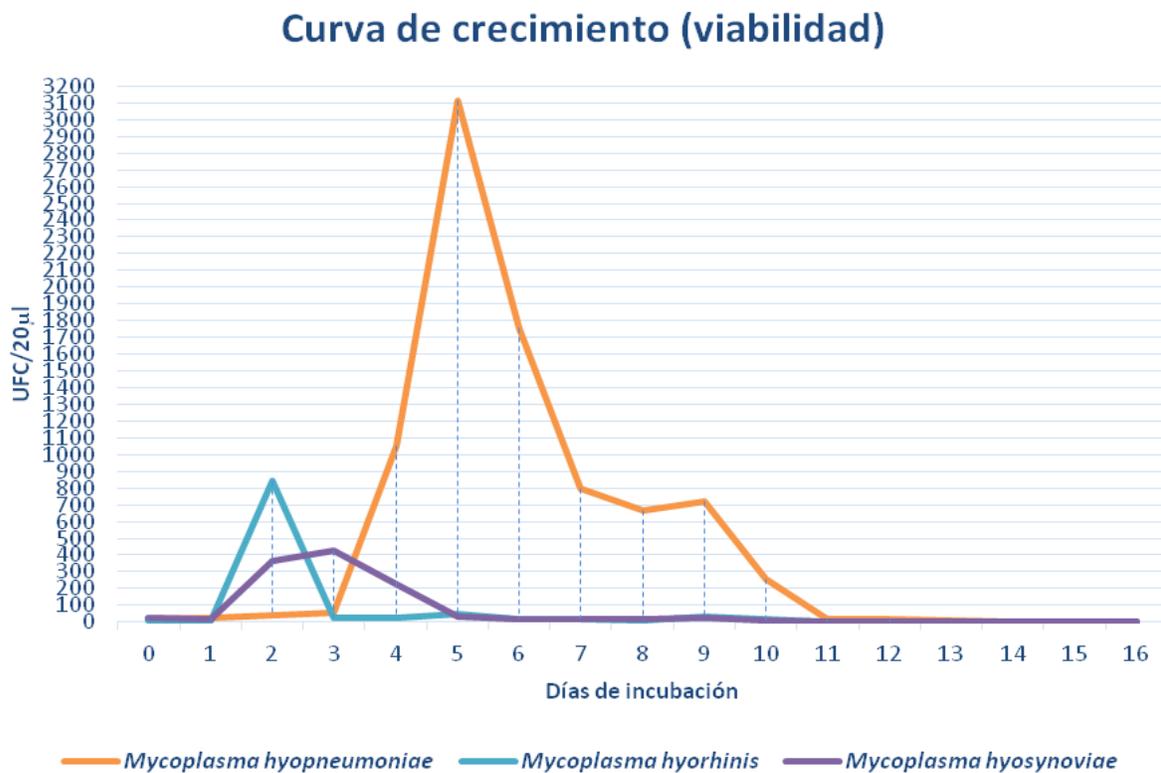


Figura 10. Curva de crecimiento de las tres especies de micoplasmas durante 15 días de incubación.

6.2 Identificación de colonias compatibles con micoplasmas en muestras clínicas y cepas de referencia en los diferentes métodos.

De las 110 muestras analizadas, 39 (35.45%) fueron positivas al desarrollo de colonias similares a micoplasmas en medio semisólido de Friis al menos una vez para los tres diferentes métodos establecidos (**Figura 11**) y 71 (64.55%) fueron negativas.

De las 39 muestras positivas, 25 (22.72%) corresponden a muestras de pulmón y 14 (12.72%) a muestras de hisopo nasal.

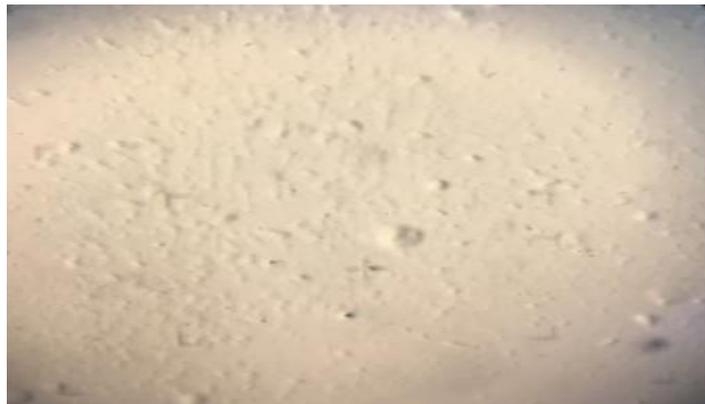


Figura 11. Formas similares a micoplasma a partir de muestra clínica en el medio semisólido de Friis, observadas en microscopio estereoscópico a 3.5 X.

En las cepas de referencia se observaron colonias de micoplasmas en medio semisólido de Friis (**Figura 12**), a partir de los 4 días de incubación en el caso de *M. hyopneumoniae* y a los 3 días en *M. hyorhinae* y *M. hyosynoviae*, en los tres métodos.

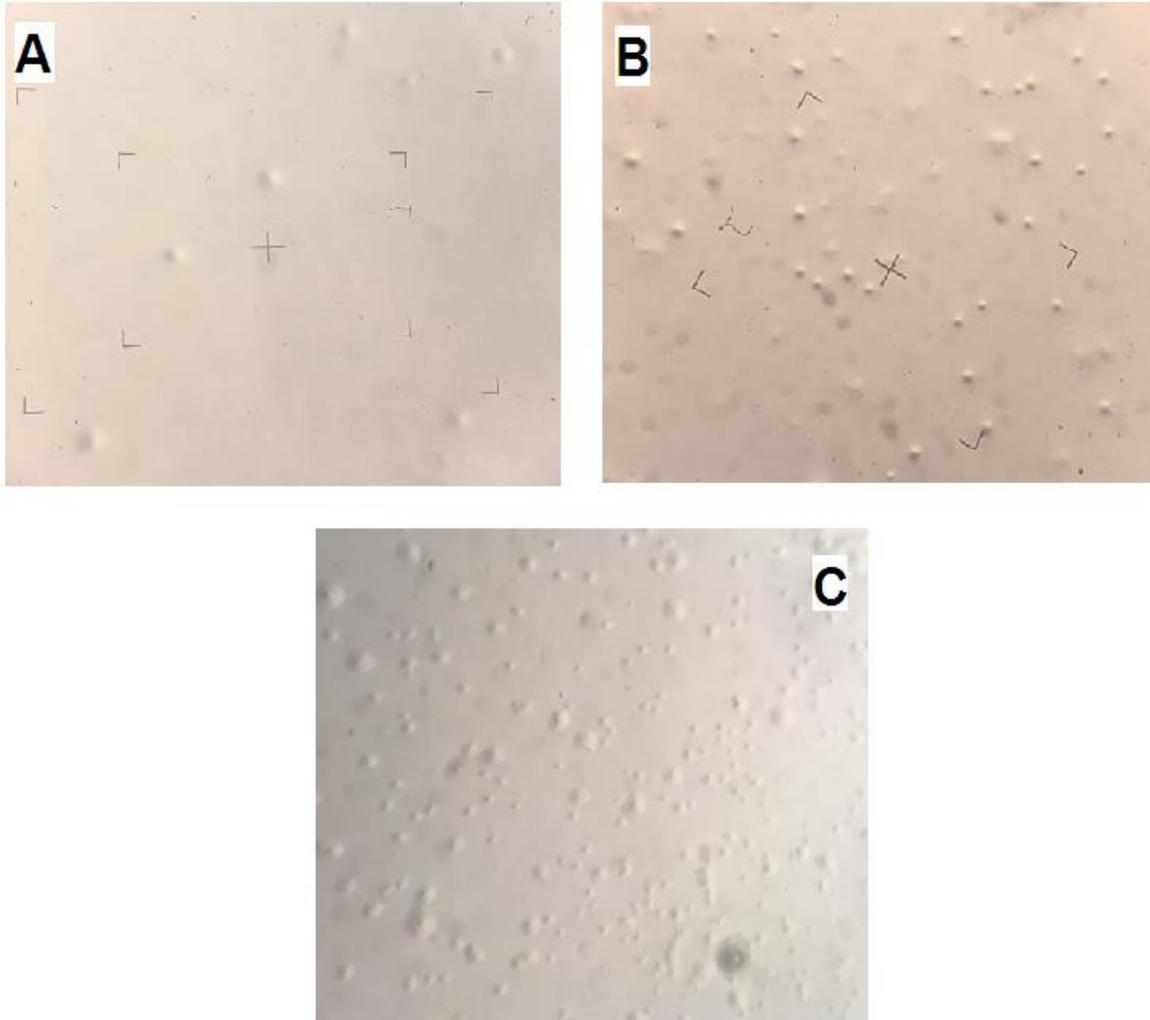


Figura 12. Colonias de micoplasmas de las cepas de referencia en el medio semisólido de Friis, observadas en microscopio estereoscópico a 3.5 X. A (*Mycoplasma hyopneumoniae*), B (*Mycoplasma hyosynoviae*) y C (*Mycoplasma hyorhinis*).

6.2.1 Método 1

De los 63 pulmones procesados e incubados por 3, 7 y 15 días, se observaron formas sugerentes a colonias de *Mycoplasma sp.* en 25 (9.68%) muestras y 38 (60.31%) fueron negativas. En el día 7 de incubación el 96% de las muestras fueron positivas al desarrollo de colonias (**Cuadro 8**).

Con este método, se observó desarrollo de colonias al día 3 de incubación en las cepas de referencia de *M. hyorhinis* y *M. hyosynoviae*, mientras que la cepa de *M. hyopneumoniae* mostró desarrollo de colonias hasta el día 7 (**Cuadro 8**).

| Cuadro 8. Colonias similares a micoplasma en muestras de pulmón. | | | | | |
|---|------------|-------------------------|--------------------------------------|-------|--------|
| # Muestra | ID interna | Procedencia | Observación de colonias (dilución 3) | | |
| | | | Día 3 | Día 7 | Día 15 |
| | | | 24 ml | 36 ml | 48 ml |
| 1 | 183 | Estado de México | - | + | - |
| 2 | 194 | Estado de México | - | + | + |
| 3 | 206 | Estado de México | - | + | + |
| 4 | 243 | Estado de México | - | + | - |
| 5 | 244 | Estado de México | - | + | - |
| 6 | 245 | Estado de México | - | + | - |
| 7 | 246 | Estado de México | - | + | - |
| 8 | 247 | Estado de México | - | + | - |
| 9 | 251 | Estado de México | - | + | - |
| 10 | 252 | Estado de México | - | + | + |
| 11 | 253 | Estado de México | - | + | - |
| 12 | 256 | Estado de México | - | + | + |
| 13 | 259 | Estado de México | - | + | - |
| 14 | 263 | Estado de México | - | - | + |
| 15 | 267 | Estado de México | - | + | - |
| 16 | 273 | Estado de México | - | + | + |
| 17 | 274 | Estado de México | - | + | - |
| 18 | 293 | Estado Jalisco | - | + | - |
| 19 | 295 | Estado Jalisco | - | + | + |
| 20 | 301 | Estado Jalisco | - | + | - |
| 21 | 302 | Estado Jalisco | - | + | - |
| 22 | 303 | Estado Jalisco | - | + | - |
| 23 | 308 | Estado Jalisco | - | + | - |
| 24 | 309 | Estado de México | - | + | - |
| 25 | 314 | Estado de México | - | + | + |
| Total de muestras positivas | | | 0 | 24 | 8 |
| Total de muestras negativas | | | 63 | 39 | 55 |
| Cepas de referencia (Controles +) | | <i>M. hyopneumoniae</i> | - | + | + |
| | | <i>M. hyorhinis</i> | + | + | + |
| | | <i>M. hyosynoviae</i> | + | + | + |

6.2.2 Método 2

De las 47 muestras de hisopo nasal incubadas en medio de Friis durante 4, 10, 20 y 30 días, solo 14 (29.78%) muestras fueron positivas al desarrollo de colonias sugerentes a micoplasmas y 33 (70.22%) fueron negativas.

Las cepas de referencia fueron positivas en todos los períodos de incubación, excepto *Mycoplasma hyorhinis* para el día 30 de incubación (**Cuadro 9; Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

| Cuadro 9. Colonias similares a micoplasma en muestras de hisopos nasales. | | | | | | |
|--|------------|-------------------------|--------------------------------------|--------|--------|--------|
| # Muestra | ID interna | Procedencia | Observación de colonias (dilución 3) | | | |
| | | | Día 4 | Día 10 | Día 20 | Día 30 |
| | | | 16 ml | 24 ml | 40 ml | 56 ml |
| 1 | 9 | Edo. Méx (OTUMBA) | - | + | - | - |
| 2 | 11 | Edo. Méx (OTUMBA) | - | + | + | + |
| 3 | 112 | Edo. Méx (OTUMBA) | - | + | + | - |
| 4 | 117 | Edo. Méx (OTUMBA) | - | - | + | - |
| 5 | 118 | Edo. Méx (OTUMBA) | - | + | + | + |
| 6 | 123 | Edo. Méx (OTUMBA) | + | - | - | + |
| 7 | 125 | Edo. Méx (OTUMBA) | - | - | + | + |
| 8 | 127 | Edo. Méx (OTUMBA) | + | - | + | + |
| 9 | 128 | Edo. Méx (OTUMBA) | + | - | + | - |
| 10 | 131 | Edo. Méx (OTUMBA) | + | - | + | + |
| 11 | 132 | Edo. Méx (OTUMBA) | + | - | + | - |
| 12 | 133 | Edo. Méx (OTUMBA) | + | + | + | + |
| 13 | 134 | Edo. Méx (OTUMBA) | + | - | + | - |
| 14 | 135 | Edo. Méx (OTUMBA) | - | - | + | - |
| Total de nuestras positivas | | | 7 | 5 | 12 | 7 |
| Total de muestras negativas | | | 40 | 42 | 35 | 40 |
| Cepas de referencia (Controles +) | | <i>M. hyopneumoniae</i> | + | + | + | + |
| | | <i>M. hyorhinis</i> | + | + | + | - |
| | | <i>M. hyosynoviae</i> | + | + | + | + |

6.2.3 Método 3

De las 22 muestras filtradas de hisopo nasal, 2 (9.09%) fueron positivas a la observación de colonias de micoplasmas a los 9 días de incubación, cuya identificación coincide con colonias observadas al día 10 de incubación en el método 2, y 20 (90.91%) fueron negativas. Las tres cepas de referencia (*M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* y *M. hyosynoviae*) fueron positivas también al desarrollo de colonias a los 9 días de incubación (**Cuadro 10**).

| Cuadro 10. Colonias similares a micoplasma en muestras de hisopos nasales filtrados. | | | |
|---|------------|-------------------------|--------------------------------------|
| # Muestra | ID interna | Procedencia | Observación de colonias (dilución 1) |
| | | | Día 9 |
| | | | 10 ml |
| 1 | 9 | Edo. Méx (OTUMBA) | + |
| 2 | 11 | Edo. Méx (OTUMBA) | + |
| Total de muestras positivas | | | 2 |
| Total de muestras negativas | | | 20 |
| Cepas de referencia (Controles +) | | <i>M. hyopneumoniae</i> | + |
| | | <i>M. hyorhinis</i> | + |
| | | <i>M. hyosynoviae</i> | + |

6.3 Concentración de ADN amplificada por la PCR

6.3.1 Cepas de referencia

En el **Cuadro 11**, se observa la concentración de ADN en ng/10 µl, a partir de las diluciones de las cepas de referencia y el resultado obtenido en la PCR para el gen de la ARN ribosomal 16S de cada una de las especies de micoplasmas.

| Cuadro 11. Concentración de ADN en ng / 10 µl amplificada por la PCR | | | | | | | | |
|--|---|----------------------|---------------|--|------------|--|-----------|------------------------------------|
| D i l u c i ó n | <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> ATTC 25617 (Figura 14) | | | <i>Mycoplasma hyosynoviae</i> (Figura 15) | | <i>Mycoplasma hyorhinis</i> ATCC 23234 (Figura 16) | | |
| | ng / 10 µl | Producto amplificado | | | ng / 10 µl | Producto amplificado 585 pb | ng /10 µl | Producto amplificado 1129 pb |
| | | 491 pb F1 | 1000 pb F2 | 588 pb F3 | | | | |
| 10 ⁰ | 7,350 | + | + | + | 4,650 | + | 33,100 | + |
| 10 ⁻¹ | 3,800 | + | + | + | 3,450 | + | 7,800 | + |
| 10 ⁻² | 1,450 | + | + | + | 2,050 | + | 4,550 | + |
| 10 ⁻³ | 850 | - | - | - | 1,050 | + | 1,050 | - |
| 10 ⁻⁴ | 750 | - | - | - | 250 | - | 400 | - |

En la **Figura 13** (A, B y C) se observan los productos de amplificación de la PCR a partir de las diluciones de ADN de *Mycoplasma hyopneumoniae*, en donde se visualiza que la dilución 10⁻² (1450 ng / 10 µl) es la cantidad mínima necesaria de ADN, para obtener un resultado positivo para los tres fragmentos de la ARN ribosomal 16S (F1, F2 y F3).

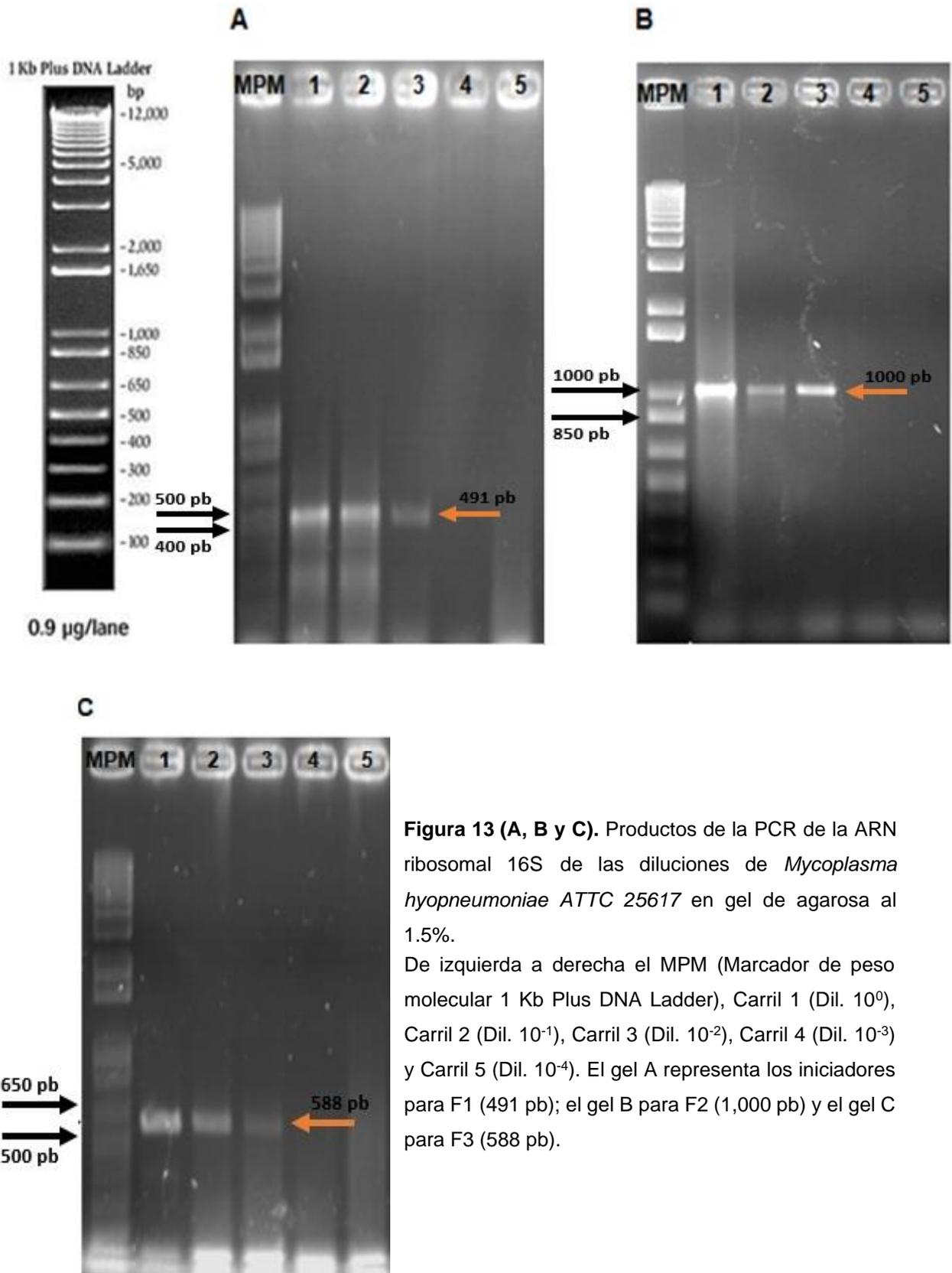


Figura 13 (A, B y C). Productos de la PCR de la ARN ribosomal 16S de las diluciones de *Mycoplasma hyopneumoniae* ATTC 25617 en gel de agarosa al 1.5%.

De izquierda a derecha el MPM (Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder), Carril 1 (Dil. 10^0), Carril 2 (Dil. 10^{-1}), Carril 3 (Dil. 10^{-2}), Carril 4 (Dil. 10^{-3}) y Carril 5 (Dil. 10^{-4}). El gel A representa los iniciadores para F1 (491 pb); el gel B para F2 (1,000 pb) y el gel C para F3 (588 pb).

En la **Figura 14** se observan los productos de amplificación de la PCR para la ARN ribosomal 16S de *Mycoplasma hyosynoviae*, en donde se visualiza que la dilución 10^{-3} (1,050 ng / 10 μ l) es la cantidad mínima necesaria de ADN, para un producto de amplificación.

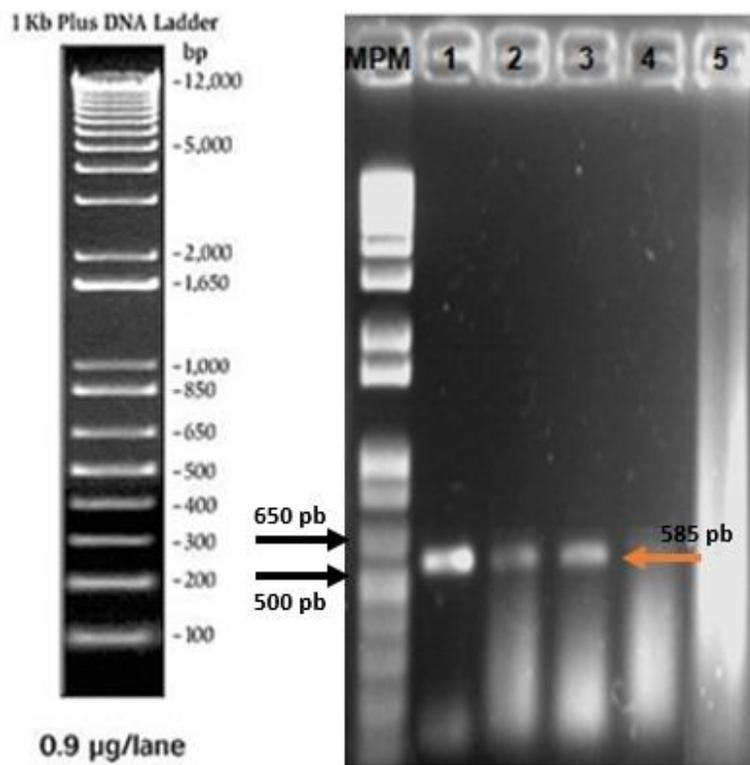


Figura 14. Productos de PCR de la ARN ribosomal 16S de las diluciones de *Mycoplasma hyosynoviae* (585 pb), en gel de agarosa al 1.5%.

De izquierda a derecha el MPM (Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder), Carril 1 (Dil. 10^0), Carril 2 (Dil. 10^{-1}), Carril 3 (Dil. 10^{-2}), Carril 4 (Dil. 10^{-3}) y Carril 5 (Dil. 10^{-4}).

En la **Figura 15** se observan los productos de amplificación de la PCR para la ARN ribosomal 16 S de *Mycoplasma hyorhinis*, en donde se visualiza que la dilución 10^{-2} (4,550 ng / 10 μ l) es la cantidad mínima necesaria de ADN, para obtener resultados positivos.

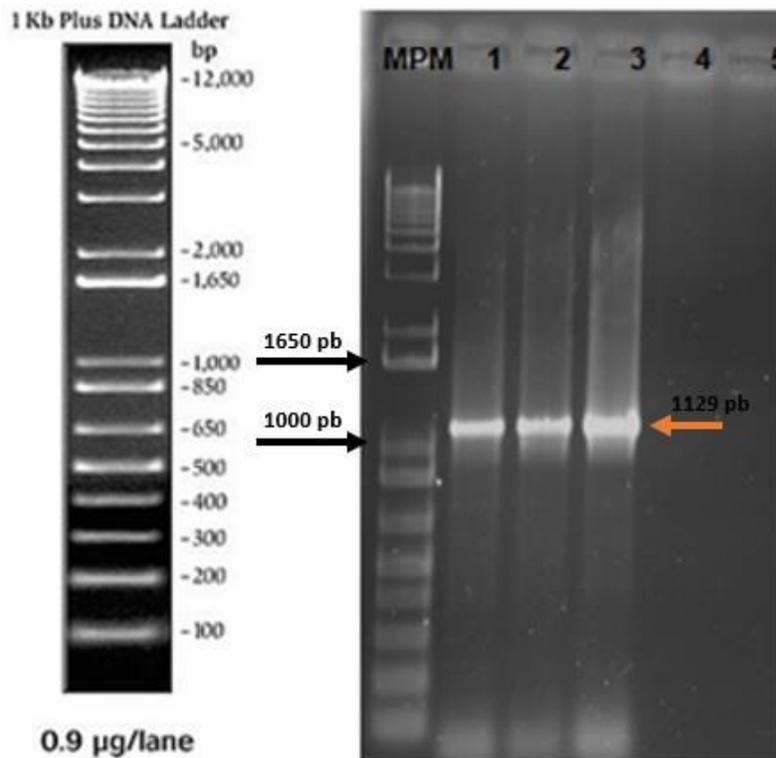


Figura 15. Productos de PCR de la ARN ribosomal 16S de las diluciones de *Mycoplasma hyorhinis* ATCC 23234 (1,129 pb), en gel de agarosa al 1.5%.

De izquierda a derecha el MPM (Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder), Carril 1 (Dil. 10^0), Carril 2 (Dil. 10^{-1}), Carril 3 (Dil. 10^{-2}), Carril 4 (Dil. 10^{-3}) y Carril 5 (Dil. 10^{-4}).

6.3.2 Muestras clínicas

La concentración de ADN en ng/10 µl de las muestras clínicas mostró una diferencia notable en comparación con las cepas de referencia para los diferentes métodos (**Cuadro 12**).

| Cuadro 12. Concentración de ADN en ng / 10 µl en muestras clínicas | | | | | | | |
|--|----------------------|----------------------|--------|------------------|---------------------|----------------|----------------|
| Método | Concentración mínima | Concentración máxima | Rango | Media aritmética | Cepas de referencia | | |
| | | | | | <i>M. hyop</i> | <i>M. hyos</i> | <i>M. hyor</i> |
| ng / 10 µl | | | | | | | |
| 1 | 1,350 | 49,370 | 48,020 | 12,384 | 3,360 | 2,070 | 835 |
| 2 | 4,330 | 58,295 | 53,965 | 15,054 | 3,090 | 2,690 | 1,410 |
| 3 | 380 | 13,635 | 13,255 | 2,276 | 870 | 410 | 125 |

6.4 Identificación de *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis* y *Mycoplasma hyosynoviae* por PCR en los diferentes métodos.

6.4.1 Método 1

De las 63 muestras de pulmón procesadas e incubadas durante 3, 7 y 15 días, se obtuvo un total de 4/63 (6.34 %) muestras positivas para la técnica de PCR y 59/63 (93.66 %) muestras negativas.

Para la ARN ribosomal 16S de *Mycoplasma hyopneumoniae*, se observaron productos de amplificación el día 7 de incubación en 2 muestras, una fue positiva para el fragmento F1 y otra para el fragmento F3 (

Figura 16).

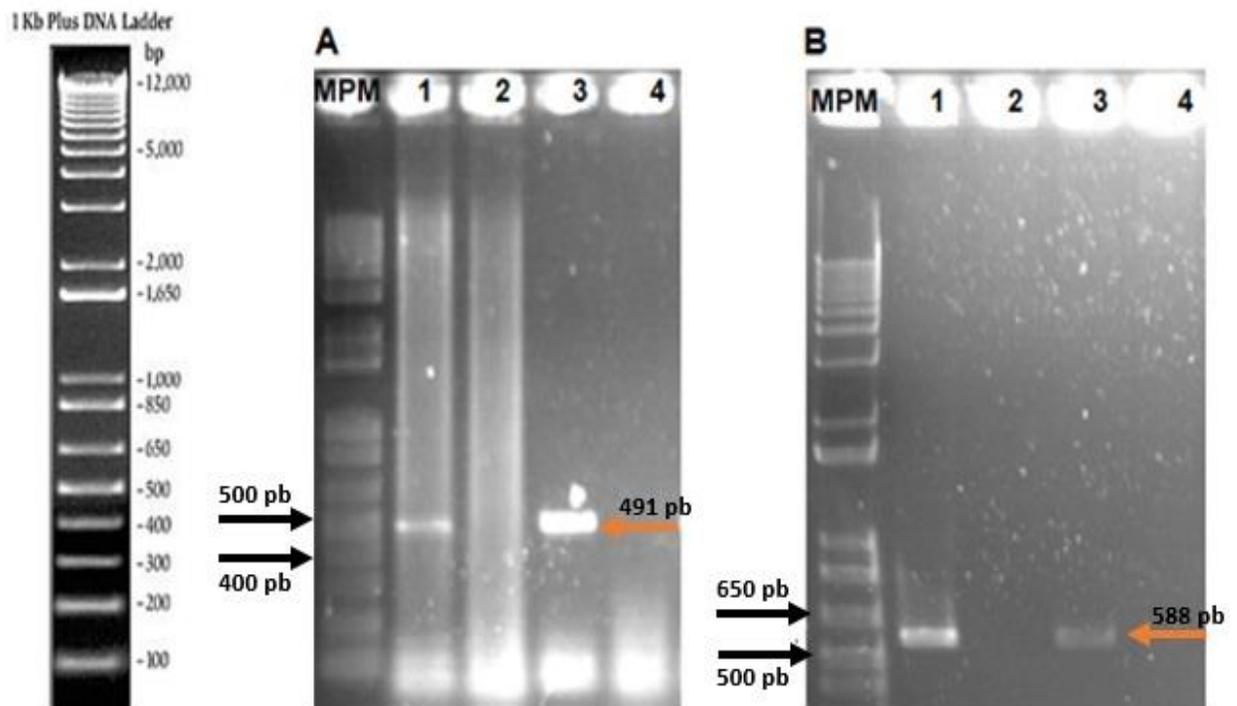


Figura 16. Productos de la PCR, para la ARN ribosomal 16S de *Mycoplasma hyopneumoniae*, en gel de agarosa al 1.5%.

A: 7 días de incubación, F1 (491 pb).

MPM, Carril 1 (Control +), Carril 2 y 4 (Muestras negativas), Carril 3 (Muestra positiva "301").

B: 7 días de incubación, F3 (588 pb).

MPM, Carril 1 (Control +), Carril 2 y 4 (Muestras negativas), Carril 3 (Muestra positiva "295").

En el caso de la ARN ribosomal 16S de *Mycoplasma hyosynoviae* se observaron resultados positivos a la técnica de PCR en 2 muestras, una fue positiva el día 7 y 15 de incubación y otra muestra solo fue positiva el día 15 (**Figura 17**). Para *Mycoplasma hyorhinis*, no se observó ningún producto amplificación en la PCR.

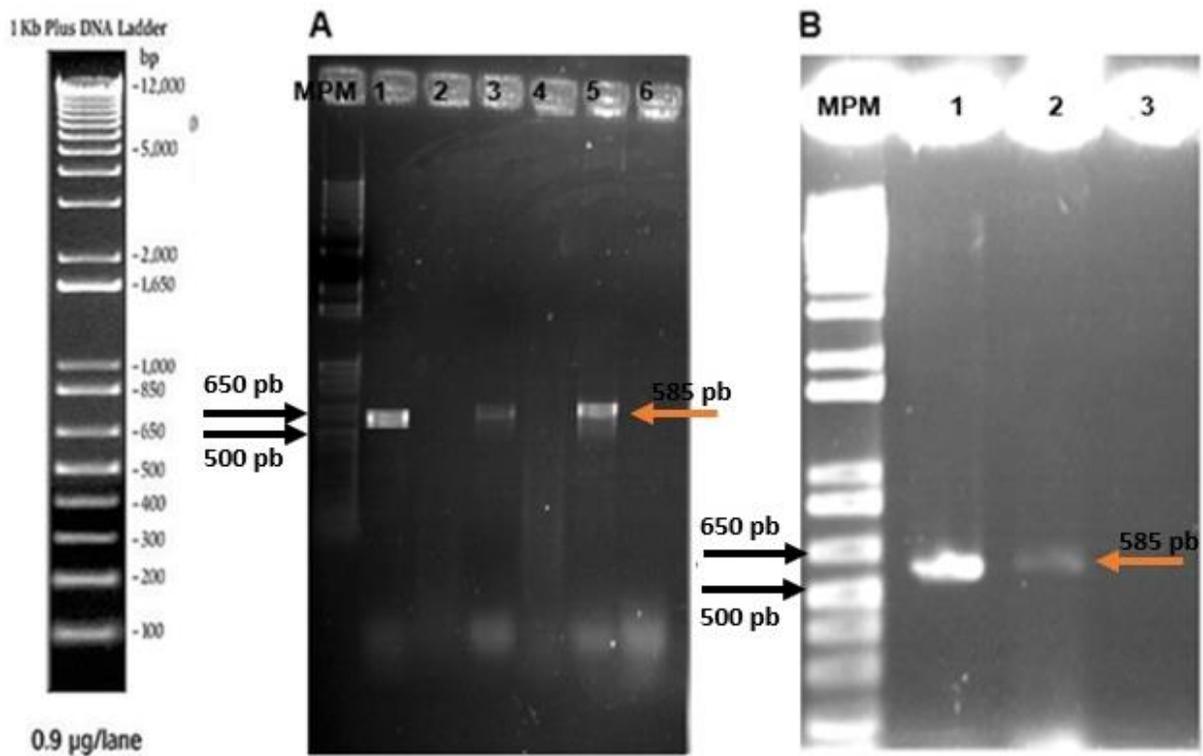


Figura 17. Productos de la PCR, para la ARN ribosomal 16S de *Mycoplasma hyosynoviae* (585 pb), en gel de agarosa al 1.5%.

A (15 días de incubación)

MPM, Carril 1 (Control +), Carril 2, 4 Y 6 (Muestras negativas), Carril 3 y 5 (Muestras positivas "252 y 256").

B (7 días de incubación)

MPM, Carril 1 (Control +), Carril 2 (Muestra positiva "256"), Carril 3 (Muestra negativa).

Las 4 muestras de pulmón positivas a la PCR, *Mycoplasma hyopneumoniae* (2) y *Mycoplasma hyosynoviae* (2) también fueron positivas al desarrollo de colonias típicas de micoplasmas en los días 7 y 15 de incubación (**Cuadro 13**).

Para las cepas de referencia, los productos de amplificación para *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Mycoplasma hyosynoviae* se observaron el día 7 y 15 de incubación, mientras que *Mycoplasma hyorhinis* no amplificó en ninguno de los días establecidos (**Cuadro 13**).

| # Muestra | | Observación de colonias | | Cuadro 13. PCR para la ARN ribosomal 16S (Método 1) | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------------|-------------------------|-------------------------|----|---|----|----|-------|----|----|--------|----|----|-----------------------|-------|--------|---------------------|-------|--------|
| | | | | <i>M. hyopneumoniae</i> | | | | | | | | | <i>M. hyosynoviae</i> | | | <i>M. hyorhinis</i> | | |
| | | | | Día 3 | | | Día 7 | | | Día 15 | | | Día 3 | Día 7 | Día 15 | Día 3 | Día 7 | Día 15 |
| | | | | F1 | F2 | F3 | F1 | F2 | F3 | F1 | F2 | F3 | 3 | 7 | 15 | 3 | 7 | 15 |
| 252 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | | |
| 256 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | | |
| 295 | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| 301 | + | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| Total de muestras positivas | | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | | |
| Total de muestras negativas | | 63 | 63 | 63 | 62 | 63 | 62 | 63 | 63 | 63 | 63 | 62 | 61 | 63 | 63 | 63 | | |
| Cepas de referencia (Controles +) | <i>M. hyopneumoniae</i> | - | - | - | + | + | + | + | + | | | | | | | | | |
| | <i>M. hyosynoviae</i> | | | | | | | | | - | + | + | | | | | | |
| | <i>M. hyorhinis</i> | | | | | | | | | | | | | - | - | - | | |

6.4.2 Método 2

De las 47 muestras de hisopos nasal incubadas durante 4, 10, 20 y 30 días, no se obtuvieron resultados positivos en la PCR para la ARN ribosomal 16S, en ninguna de las tres especies de micoplasmas (*Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis* y *Mycoplasma hyosynoviae*). En las cepas control se observaron productos de amplificación para *Mycoplasma hyopneumoniae* los días 10, 20 y 30 de incubación y para *Mycoplasma hyosynoviae* y *Mycoplasma hyorhinis* los días 20 y 30 (**Cuadro 14**).

| Microorganismo | Cuadro 14. PCR para la ARN ribosomal 16S (Método 2) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------|---|----|----|--------|----|----|--------|----|----|-----------------------------|----|----|-------|-------------------------------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|---|---|
| | <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> | | | | | | | | | <i>Mycoplasma hyorhinis</i> | | | | <i>Mycoplasma hyosynoviae</i> | | | | | | | | |
| | Día 4 | | | Día 10 | | | Día 20 | | | Día 30 | | | Día 4 | Día 10 | Día 20 | Día 30 | Día 4 | Día 10 | Día 20 | Día 30 | | |
| | F1 | F2 | F3 | F1 | F2 | F3 | F1 | F2 | F3 | F1 | F2 | F3 | Día 4 | Día 10 | Día 20 | Día 30 | Día 4 | Día 10 | Día 20 | Día 30 | | |
| Total muestras positivas | 0 | | | | | | | | | 0 | | | | 0 | | | | | | | | |
| Total muestras negativas | 47 | | | | | | | | | 47 | | | | 47 | | | | | | | | |
| <i>M. hyopneumoniae</i> | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | | | | | | | | | |
| <i>M. hyorhinis</i> | | | | | | | | | | | | | - | - | + | + | | | | | | |
| <i>M. hyosynoviae</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | - | - | + | + |

6.4.3 Método 3

De las 22 muestras de hisopos nasal filtradas e incubadas por 9 días, se obtuvieron 10/22 (45.45%) muestras que amplificaron el fragmento F3 (588 pb) de la ARN ribosomal 16S de *Mycoplasma hyopneumoniae* y 12/22 (54.55%) muestras fueron negativas (**Cuadro 15** y **Figura 18**).

De las 10 muestras positivas a la PCR solo 2 desarrollaron morfología típica de micoplasmas. En los controles, la única cepa de referencia que amplificó fue *Mycoplasma hyopneumoniae* (Cuadro 15).

| Cuadro 15. PCR para la ARN ribosomal 16S (Método 3) | | | | | | |
|---|-------------------------|-------------------------|----|----|-----------------------|---------------------|
| # Muestra | Observación de colonias | <i>M. hyopneumoniae</i> | | | <i>M. hyosynoviae</i> | <i>M. hyorhinis</i> |
| | | F1 | F2 | F3 | | |
| 2 | - | - | - | + | - | - |
| 6 | - | - | - | + | - | - |
| 7 | - | - | - | + | - | - |
| 9 | + | - | - | + | - | - |
| 11 | + | - | - | + | - | - |
| 13 | - | - | - | + | - | - |
| 14 | - | - | - | + | - | - |
| 18 | - | - | - | + | - | - |
| 20 | - | - | - | + | - | - |
| 22 | - | - | - | + | - | - |
| Total de muestras positivas | | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 |
| Total de muestras negativas | | 22 | 22 | 12 | 22 | 22 |
| Cepas de referencia (Controles +) | <i>M. hyopneumoniae</i> | + | + | + | | |
| | <i>M. hyosynoviae</i> | | | | - | |
| | <i>M. hyorhinis</i> | | | | | - |

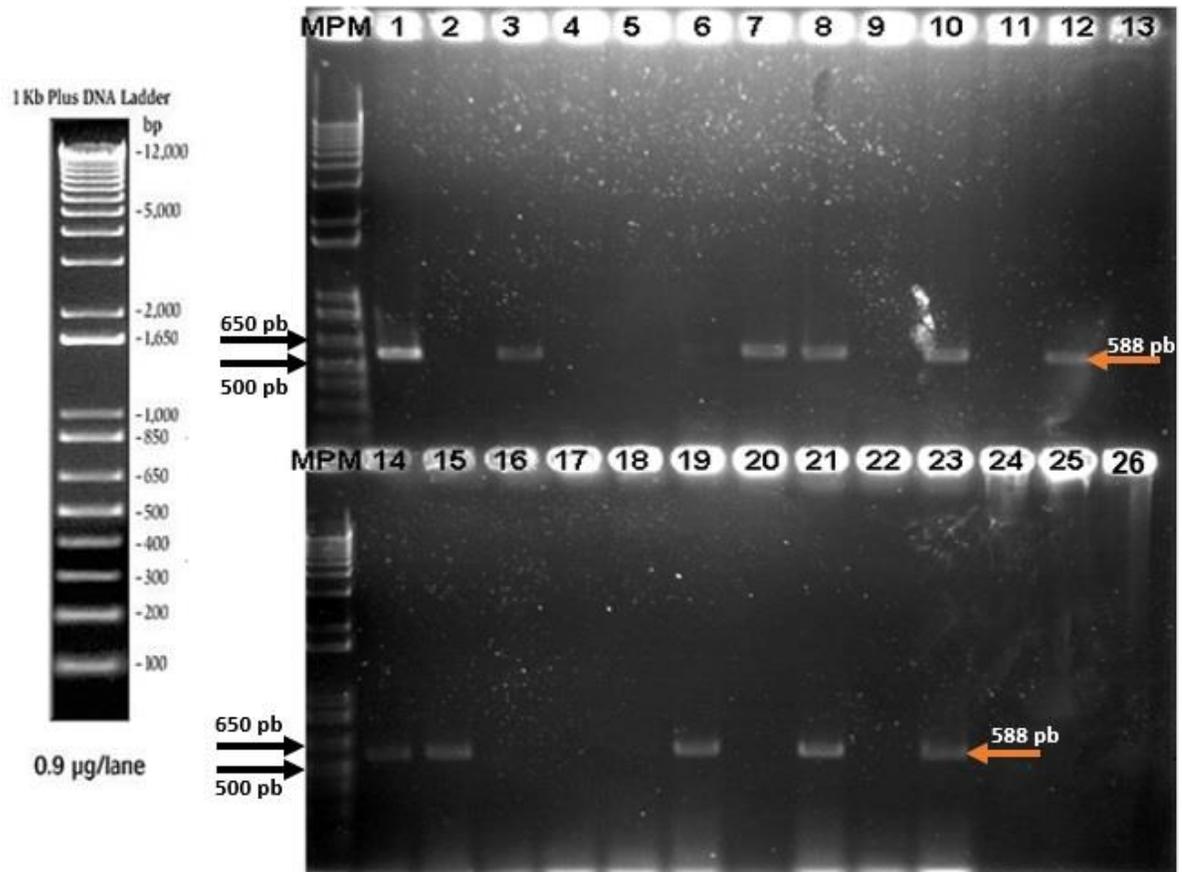


Figura 18. Productos de PCR de la ARN ribosomal 16S de *Mycoplasma hyopneumoniae* fragmento F3 (588 pb), en gel de agarosa al 1.5%, de las muestras filtradas de hisopo nasal incubadas por 9 días.

De izquierda a derecha el MPM (Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder), Carril 1 (Control positivo), Carril 3, 7, 8, 10, 12, 14, 15, 19, 21 y 23 (Muestras positivas), Carril 2, 4-6, 9, 11, 13, 16-18, 20 y 22 (Muestras negativas), Carril 24, 25 y 26 (Sin muestra).

7. DISCUSIÓN

7.1 Identificación de formas similares a Micoplasmas.

Swinnen I., *et al.*, 2004 mencionan que una cepa de campo necesita un mayor tiempo de adaptación al medio de cultivo *in vitro*, lo que coincide con el comportamiento acelerado presentado por las cepas de referencia para cada uno de los métodos, a diferencia de las cepas obtenidas a partir de las muestras clínicas.

Durante el estudio, también se observó que *Mycoplasma hyopneumoniae* no desarrolló colonias al día 3 de incubación en el método 1, pero si se observó en los demás días de incubación de los diferentes métodos, al igual que *Mycoplasma hyorhinis* y *Mycoplasma hyosynoviae*, lo que coincide con lo reportado por Lin J. *et.al.*, 2006 donde mencionan que la observación de colonias se da entre los 4-30 días para *M. hyopneumoniae*, de 2-5 días para *M. hyorhinis* y desde el primer día para *M. hyosynoviae*, en medio semisólido de Friis.

Acosta B., *et.al.*, 2011 describen que el crecimiento de colonias típicas de micoplasma en medio semisólido, solo permite establecer una identificación presuntiva, pues existen géneros como *Acholeplasma spp.*, que presentan un desarrollo de colonias similar y es por ello que para tener la certeza de la identificación del género *Mycoplasma spp.*, es necesario realizar pruebas bioquímicas, de filtrabilidad en 0.45 µm, identificación de formas “L” y digitonina para observar el requerimiento de esteroides, porque existen especies no patógenas como *Mycoplasma flocculare*, descrita por Armstrong C. en 1982 como

habitante comensal del tracto respiratorio, sin embargo, en este estudio no se realizaron estas pruebas por lo que la observación de colonias en medio semisólido no es indicativo de tener muestras positivas del género *Mycoplasma spp.*

7.2 Identificación molecular de especies de micoplasmas en muestras clínicas.

En cuanto a la identificación molecular, en un estudio realizado por Friis N. en 1971, sobre 71 pulmones de cerdo, se demostró la presencia por aislamiento de *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* y *M. hyosynoviae* en un 62%, 38% y 11% respectivamente. Por otro lado, Poveda C. en 2012, trabajó con 86 muestras de pulmón, reportando un 66.6% de muestras positivas para *M. hyorhinis*, un 33.3% para *M. hyopneumoniae* y un 5.5% para *M. hyosynoviae* por la técnica de PCR para el gen de la ARNr 16S. En comparación, en nuestro estudio se trabajaron con 63 muestras de pulmón, en el cual se confirmó la presencia del 0% para *M. hyorhinis*, 5.27% para *M. hyopneumoniae* y 5.27% para *M. hyosynoviae*, con la técnica de PCR para el gen de la ARNr 16S, notándose una diferencia considerable entre los datos obtenidos y los porcentajes descritos por ambos autores, sobre todo para *M. hyorhinis* y *M. hyopneumoniae*, siendo el método 1 descrito en este trabajo, de poca utilidad para el diagnóstico de animales positivos a *Mycoplasma spp.*

En otro estudio, realizado por López G., 2020; se trabajaron las 110 muestras (63 pulmones y 47 hisopos nasales) del presente trabajo, con el método para el aislamiento de micoplasmas descrita por Goodwin R., 1972, donde una vez observadas las colonias en medio semisólido de Friis, fueron purificadas e identificadas como *Mycoplasma spp.*, posteriormente se hizo crecer cada cepa a 100 ml para la extracción de ADN y realizar la PCR para la identificación de *Mycoplasma hyopneumoniae*. El método duró 30 días y para obtener la extracción de ADN fueron otros 30 días, obteniendo como resultado 38/63 (60.31%) de muestras positivas a la 16S ribosomal de *Mycoplasma hyopneumoniae*. En contraste con este trabajo, se pudo realizar la identificación de *Mycoplasma hyopneumoniae* con el método 1, al día 7 de incubación del cultivo *in vitro*, sin embargo, el porcentaje 2/63 (5.27%) de muestras positivas fue menor, por lo que, al disminuir tiempo de identificación, se sacrifica un porcentaje considerable de positividad.

En el mismo estudio, con respecto a las muestras de hisopo nasal, se obtuvieron 7/22 (31.81%) muestras positivas a la PCR para la identificación de *Mycoplasma hyopneumoniae* a los 30 días de incubación. Mientras que, en este estudio, se observó un porcentaje similar 10/22 (45.45%) con el método 3, en las muestras filtradas de hisopo nasal a los 9 días de incubación. Con estos resultados podemos mencionar que es posible acortar los tiempos de identificación, utilizando la técnica de PCR para el diagnóstico de animales positivos a *Mycoplasma hyopneumoniae* en muestras de hisopo nasal, muestra adecuada para la detección de Micoplasmas, según lo descrito por Pieters M. y Rovira A.,

2013. Por lo que, se sugiere que el método 3 es quizá también de utilidad para el procesamiento de muestras de pulmón, eliminando así residuos de células pulmonares que quedan en el proceso de triturado que contengan sustancias bactericidas y no permitan el desarrollo bacteriano, según lo descrito por Whitford H., 1994.

Por otro lado, la obtención de muestras que fueron positivas a la PCR pero negativas a colonias de micoplasmas, puede asociarse al uso previo de antimicrobianos en los animales, pues Butch R. y Ramírez A., 2014 mencionan que los productos más utilizados en la industria porcina para el tratamiento de la micoplasmosis son los macrólidos, tetraciclinas y lincosamidas, que actúan inhibiendo la síntesis de proteínas, por lo que fungen como bacteriostáticos, impidiendo la multiplicación bacteriana y por lo tanto el desarrollo de colonias, pero es posible la detección de ADN con técnicas moleculares si estos microorganismos se encuentran en la muestra. Sin embargo, en este trabajo la influencia del uso de antimicrobianos no puede ser corroborada debido a la falta de estos datos, pero se reconoce, es de suma importancia tanto para la elección de animales a muestrear, como la necesidad de realizar diluciones en el procesamiento de las muestras para diluir factores contaminantes que influyan en los resultados de las reacciones de PCR.

Finalmente, otro factor importante en la obtención de resultados es la incubación previa de los cultivos en medios líquidos de hasta 7 días, según lo descrito por Kleven en el 2003, con la finalidad de maximizar la identificación de micoplasmas.

Esto es constatado por un estudio realizado por Tapia E. en el 2006 donde se obtuvo un 2% de resultados positivos a *Mycoplasma spp.* en cultivos sin una previa incubación y del 32% a partir de cultivos previamente incubados. Mientras que en nuestro estudio se obtuvo un 5.27% en cultivos incubados previamente por 7 días para la identificación de *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Mycoplasma hyosynoviae* con el método 1 y un 45.45% en cultivos incubados por 9 días para la identificación de *Mycoplasma hyopneumoniae* con el método 3, mientras que en muestras incubadas por solo 4 días en el método 2, no hubo resultados favorables.

8. CONCLUSIONES

PRIMERA: *Mycoplasma hyosynoviae* y *Mycoplasma hyopneumoniae* fueron detectados en diluciones incubadas de 7 y 15 días para las muestras de pulmón por la técnica de PCR.

SEGUNDA: A partir de los hisopos con una incubación de 9 días y un prefiltrado, se pudo obtener un porcentaje de 45.45%, pudiendo ser factible la reducción de los tiempos para la detección de *Mycoplasma hyopneumoniae* por medio de la PCR.

9. REFERENCIAS

1. Acosta B., Codina M., Matas L. y Meseguer M.; “Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Mycoplasma spp.* y *Ureaplasma spp.*”. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, España; 2011.
2. Arredondo J.; “Complejo Respiratorio Porcino”. BM Editores; 2019.
3. Armstrong C.; “Mycoplasmal pneumonia of swine”. International Swine Update; 1982.
4. Bachmann V., Calle S., Torres M., Gavidia C., Morales S. y Acosta F.; “Dinámica de infección con *Mycoplasma hyopneumoniae* en porcinos provenientes de madres con y sin antecedentes de inmunización”. Rev Inv Vet Perú; 17 (1): 51-57, 2006.
5. Bai F., Ni B., Liu M., Feng Z., Xiong Q. y Shao, G.; “*Mycoplasma hyopneumoniae* derived lipid-associated membrane proteins induce inflammation and apoptosis in porcine peripheral blood mononuclear cells in vitro”. Vet. Microbiol; 175(58–67), 2015.
6. Bandrick M.; “*Mycoplasma hyopneumoniae*: fisiología y dinámica de la inmunidad”. Minesota, 2014.
7. Bringas J., Vidal A., Jovellar J., Núñez P., Sánchez P., Huerta I.; “Relationship between pig performance and maximum *M.hyopneumonia*-like lung lesions at slaughterhouse”. Elanco Animal Health, España; 2014.
8. Brown D.; “Bergey's Manual of Systematic Bacteriology”. New York; 5:567, 2010.

9. Butch R. y Ramírez A.; "Control y eliminación de *Mycoplasma hyopneumoniae*". Iowa, U.S.A; 2014.
10. Calsamiglia M.; "*Mycoplasma hyopneumoniae*. Epidemiología y control.". Revista de Ciencias Veterinarias. 2004.
11. Carranza A.; "Neumonía enzoótica porcina". Vº Congreso de Producción Porcina del Mercosur, Río Cuarto. Dpto. de Patología Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, UNRC; 2006.
12. Citti C., Watson-McKown R., Drosesse M. y Wise K.; "Gene families encoding phase and size variable surface lipoproteins of *Mycoplasma hyorhinitis*". J Bacteriol. Mar; 182(5):1356-63, 2000.
13. Clavijo M.; Oliveira S. y Rovira A.; "Development of a quantitative PCR assay for the detection of *Mycoplasma hyorhinitis*". International Pig Veterinary Society Congresses. Korea; 2012.
14. Czaja T., Kanci A., Lloyd L., Markham P., Whithear K. y Browning G.; "Induction of enzootic pneumonia in pigs by the administration of an aerosol of in vitro-cultured *Mycoplasma hyopneumoniae*". Vet. Rec; 150:9-11, 2002.
15. DeBey M., Jacobson C. y Ross R.; "Histochemical and morphologic changes of porcine airway epithelial cells in response to infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*". Am J Vet Res; 53(9):1705-1710, 1992.
16. Desrosiers R., "A review of some aspects of the epidemiology diagnosis and control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections". J Swine Health: 233-237, 2001.

17. Dewey C.; "Diseases of the Nervous and Locomotor Systems. In: Disease of Swine". Iowa State University Press, Ames, Iowa, U.S.A; 861- 882, 1999.
18. Djordjevic S., Cordwell S., Djordjevic M., Wilton J. y Minion F.: "Proteolytic processing of the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesin". Infect Immun.; 72(5):2791-802, 2004.
19. Erickson B., Ross R., Rose D., Tully J. y Bové J.; "*Mycoplasma hyopharyngis*, a new species from swine". Int. J. Syst. Bacteriol. 36:55-59, 1986.
20. Fano G., *et al.*; "Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* colonization at weaning on disease severity in growing pigs". Can J Vet. 71: 195-200. 2007.
21. Fano G.; "Redefiniendo el complejo respiratorio porcino (CRP)"; Memorias AMVEC. 2019.
22. Fano G., Pijoan C. y Des S.; "Dynamics and persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection pigs". Can J. Vet. Res.; 69:223-228, 2005.
23. Ferrarini M., Siqueira F., Mucha S., Palama T., Jobard E., Herrmann B., Vasconcelos A., Tardy F., Schrank I., Zaha A. y, Sagot M.; "Insights on the virulence of swine respiratory tract mycoplasmas through genome-scale metabolic modeling". BMC Genom; 17:353, 2016.
24. Friis N.; "*Mycoplasmas* cultivated from the respiratory tract of Danish pigs". Acta vet. scand.; 12:69-79, 1971.
25. Friis N. y Feenstra A.; "*Mycoplasma hyorhinis* in the etiology of serositis among piglets". Acta Vet Scand.; 35(1):93-8, 1994.
26. Galván R.; "Diagnóstico de *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* en neonatos de unidad de cuidados intensivos del INPer, IER, mediante una

prueba de detección rápida en secreción bronquial, comparada con medios de cultivo y reacción en cadena de la polimerasa”. IPN: Escuela Superior de Medicina; 2011.

27. GenBank, Nucleic Acids Research, Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Consultado el día 15 de enero del 2019.
28. Gois M. y Taylor-Robinson D.; “The identification and characterization of some porcine arginine-utilising *Mycoplasma* strains”. J. med. Microbiol. 5:47-54, 1972.
29. Gomes J., Gauger P., Strait E., *et al.*; “*Mycoplasma* associated arthritis: Critical points for diagnosis”. J Swine Health. 20(2):82-86, 2012.
30. Goodwin R., Pomeroy P. y Whittlestone P.; “Production of enzootic pneumonia in pigs with *Mycoplasma*”. Vet. Rec.; 77:1247-1249, 1965.
31. Goodwin R.: “Isolation of *Mycoplasma suis* pneumoniae from the nasal cavities and lungs of pigs affected with enzootic pneumoniae or exposed to this infection”. Res Vet Sci; 13:262-267, 1972.
32. Hagedorn Olsen T., Nielsen N. y Friis, N.; “Induction of arthritis with *M. hyopneumoniae* in pigs: clinical response and re-isolation of the organism from body fluids and organs”. Zentralbl veterinarmed; 56:317-325, 1999.
33. Holst S., Yeske P. y Pieters M.; “Elimination of *Mycoplasma hyopneumoniae* from breed-to-wean farms: A review of current protocols with emphasis on herd closure and medication”. Journal of Swine Health and Production; 23: 321–330, 2015.

- 34.** Iowa State University, Veterinary Diagnostic Laboratory (ISUVDL); [Internet], 2016. Citado el 03 de Noviembre del 2019. Disponible en: <https://vetmed.iastate.edu/vdl>
- 35.** Jan J. y Le Borgne S.; “Uso de técnicas moleculares para realizar estudios de biodiversidad microbiana en ambientes petroleros”. *BioTecnología*; 5(3):103-109, 2001.
- 36.** Jordan D., Hoffmann L. y Thacker E. “*Pasteurella multocida* as a component of porcine respiratory disease complex”. Swine Vet Congress. Kansas City. USA.; 149-152, 2006.
- 37.** Kleven S.; “Other Mycoplasmal Infections”. *Disease of Poultry*. Iowa University Press. 772-774; 2003.
- 38.** Kleven S., Jordan F. y Badbury J.; “OIE. Manual of Diagnostics Test and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees): Avian Micoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*)”. OIE; 2:842-855, 2004.
- 39.** Kobisch M. y Friis, N.; “Swine mycoplasmoses”. *Rev. Sci. Tech. Int. Epiz.* 15:1569-1605; 1996.
- 40.** Kornspan J., Lysnyansky I., Kahan T., Herrmann R., Rottem S. y Nir-Paz R.; “Genome analysis of a *Mycoplasma hyorhinis* strain derived from a primary human melanoma cell line”. *J Bacteriol.* 2011.
- 41.** Lin J., Chen S., Yeh K. y Weng C.,” *Mycoplasma hyorhinis* en Taiwán: diagnóstico y aislamiento de patógeno neumonía porcina”. *Veterinario. Microbiol.* 115:111-116, 2006.

42. Livingstone C., Stair E., Underdahl N. y Mebus C.; "Pathogenesis of mycoplasmal pneumonia in swine". Am. J. Veto Res. 33 (11):2249-2258, 1972.
43. Lobo E., Pérez M. y Bulnes C.; "Trastornos respiratorios del cerdo en Cuba. Etiología, diagnóstico y medidas de control". Evento Centroamericano y del Caribe de Porcinocultura. Palacio de las Convenciones, La Habana, Cuba; 2005.
44. López G.; "Tipificación molecular de *Mycoplasma hyopneumoniae* en muestras de pulmón e hisopos nasales de cerdos con problemas respiratorios". UNAM, México, 2020. (NO PUBLICADO)
45. Maes D., Segales J., Meyns T., Sibila M., Pieters M. y Haesebrouck F.; "Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs". Vet. Microbiol. 126: 297-309; 2008.
46. Maes D., Sibila M., Kuhnert P., Segalés J., Haesebrouck F., Pieters M.; "Update on *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs: Knowledge gaps for improved disease control". Transboundary and Emerging Diseases. 6: 110-124; 2017.
47. Maré C. y Switzer W.; "New species: *Mycoplasma hyopneumoniae* a causative agent of virus pig pneumonia". Vet. Med. 60, 841; 1965.
48. Meyling A. y Friis N.; "Serological identification of a new porcine mycoplasma species, *M. flocculare*". Acta Vet. Scand. 13: 287-289; 1972.
49. Miles R., y Agbanyim C.; "Determination of substrate utilization rates by *Mycoplasmas*. Methods in Molecular Biology: Mycoplasma Protocols". Totowa: Humana Press; 104:95-103, 1998.

50. Miranda-Morales R., Rojas V., López L., Carrillo E., Sarmiento R., Trujillo M., Beltrán R. y Trigo F.; “Frecuencia de *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* y *M. hyosynoviae* en muestras nasales y de pulmón de cerdos con síntomas de neumonía enzoótica porcina”. FMVZ-UNAM, México, 2019.
51. Morilla A.; “Manual para el Control de las Enfermedades Infecciosas de los Cerdos”., Ciudad de México: Sagar.
52. Morita T., Fukuda H., Awakura T., Shimada A., Umemura T., Kazama S. y Yagihashi T.; “Demonstration of *Mycoplasma hyorhinis* as a possible primary pathogen for porcine otitis media”. Vet. Pathol. 32:107-111, 1995.
53. Muñoz M.; “Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Mycoplasma pneumoniae*”. Grupo de patología infecciosa de la Asociación Española de Pediatría de atención primaria AEPap. 2019.
54. Nicolet J.; “Animal mycoplasmoses: a general introduction”. Rev Sci Tech Off Int. Epiz. 15(4), 1996.
55. Nielsen E., Nielsen N. y Friis N.; “*Mycoplasma hyosynoviae* arthritis in grower-finisher pigs”. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med. 48:475-486, 2001.
56. Paz Y.; “Estudio Etiopatogénico del Complejo de Enfermedades Respiratorias Porcinas en una explotación de Gran Canaria: Efecto sobre los parámetros productivos”. Tesina de Grado. Facultad de Veterinaria. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. 2011
57. Pieters M. y Rovira A.; “Comparison of various samples types for detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in recently infected pigs”. Proceedings Allen D. Leman Swine Conference; St. Paul; 75-76, 2013.

- 58.** Pieters M.; “*Mycoplasma hyopneumoniae*: pautas para la vigilancia diagnóstico y control”. XVII Congreso Nacional, Porciaméricas. University of Minnessota. 2014.
- 59.** PISA Agropecuaria. “Impacto económico en la utilización de las combinaciones antibióticas para el tratamiento del Complejo Respiratorio Porcino”. Revista Veterinaria Argentina; 2014.
- 60.** Poveda C. “Análisis de la región intergénica ARNr 16S-23S y del gen ARNr 23S en cepas de campo de *Mycoplasma hyopneumoniae*. Estudio filogenético de los micoplasma porcinos en base al gen ARNr 23S”. Tesis Doctoral, Universidad de las palmas de Gran Canaria. 2012.
- 61.** Quinn P., Markey B., Carter M., Donnelly W. y Leonard F.; “*Mycoplasmas* In Veterinary microbiology and Microbial Disease”. London. UK; 189-195, 2002.
- 62.** Razin S. y Herrmann R.; “Molecular biology and pathogenicity of micoplasmas”; Israel: The Hebrew University- Hadassah Medical School; 2002.
- 63.** Ross R.; “Pathogenetic Factors in, and Pathogenesis of, Mycoplasmal Pneumonia”. Lemna Swine Conf; St Paul; Minnesota; 177 -179; 1996.
- 64.** Ross R. y Duncan J; “*Mycoplasma hyosynoviae* arthritis of swine”. J Am Vet Med Assoc. Dec 1; 157(11):1515-8, 1970.
- 65.** Ross R. y Karmon J.; “Heterogeneity Among Strains of *Mycoplasma granularum* and Identification of *Mycoplasma hyosynoviae*, sp”. Journal of bacteriology; 103(3):707-13, 1970.
- 66.** Ross R., Straw B., D'Allaire S., Mengeling W. y Taylor D.; “Diseases of Swine”. Ames. Prensa de la Universidad Estatal de Iowa; 495-510, 1999.

67. Rovira A., Clavijo M. y Oliveira S.; "Infección por *Mycoplasma hyorhinis* de cerdos". Acta. Sci. Veterinario; 209-215, 2010.
68. Salazar J. y Loaiza U.; "Catabolismo de los anticuerpos maternos y duración de la inmunidad vacunal de las bacterinas contra *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos". Veterinaria y Zootecnia. 48-65. 2014.
69. Sambrook J. y Rusell D.; "Molecular Cloning a Laboratory Manual"; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.
70. Schwartz K.; "Current trends and diagnostic tools". Veterinary Diagnostic and Production Animal Medicine; Iowa State University; Ames. 2016.
71. Shin J., Joo H., Lee W., Seok H., Calsaming M., Pijoan C. y Molitor T.; "Identification and characterization of cytopathogenic *Mycoplasma hyorhinis* from swine farms with a history of abortions". J. Vet Med Sci; 65(4): 501-9, 2003.
72. Sibila M., *et al.*; "Current Perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection". The Vet Journal; 181:21-231, 2009.
73. Sibila M., Mentaberre G., Boadella M., Huerta E., Casas E, Vicente J., Gortázar C., Marco I., Lavín S. y Segalés J.; "Serological, pathological and polymerase chain reaction studies on *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in the wild boar". Veterinary Microbiology; 144:1-2, 214-218, 2010.
74. Sibila M., Ciprián A., Aragón V., Dereu A. y Segales J.; "Papel del *Mycoplasma hyorhinis* en las neumonías del cerdo". Memorias AMVEC. 2015.
75. Stakenborg T., Vicca J., Butaye P., Imberechts H., Peeters J., Kruif A., Haesebrouck F. and Maes D.; "A Multiplex PCR to Identify Porcine

Mycoplasmas Presentin Broth Cultures”. Veterinary Research Communications. 30(2006):239-247; 2006.

- 76.** Strasser M., Abiven P., Kobisch M. y Nicolet J.; “Immunological and pathological reactions in piglets experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* and/or *Mycoplasma flocculare*”. Vet Immunol Immunopathol. 31: 141-153, 1992.
- 77.** Sorensen V., Ahrens P., Barfod K., Feenstra A., Feld N., Friss N., Bille-Hansen V., Jensen N. y Pedersen M. “*Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: Duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays”. Vet Microbiol. 54:23-34, 2002.
- 78.** Splitter E.; “Eperythrozoon suis and Eperythrozoon parvum, two new blood parasites of swine”. Science Ill. 513-516, 1950.
- 79.** Surprenant C.; “*Mycoplasma hyopneumoniae* serologic interpretation of herd profiles”. Proceedings American Association of Swine Practitioners 32 annual; 477; 2001.
- 80.** Swinnen I., Bernaerts K., Dens E., Geeraerds A. y Van Impe J.; “Predictive modelling on the microbial lag phase: a review”. International Journal of Food Microbiology. 94:137-159, 2004.
- 81.** Switzer W.; “Studies on infectious atrophic rhinitis. IV. Characterization of a pleuropneumonia-like organism isolated from the nasal cavities of swine”. American Journal of Veterinary Research; 16:540, 1955.
- 82.** Tamay de Dios L., Ibarra C. y Velasquillo C. “Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real”. 2:2, 2013.

- 83.** Tapia E., "Aislamiento de *Mycoplasma spp.* A diferentes tiempos de incubación de cultivo primario de gallinas comerciales": FESC-UNAM. 2006
- 84.** Thacker E.; "*Mycoplasma* diagnosis and immunity". Swine Veterinarians. Ohio. 467-469, 2001.
- 85.** Thacker E.; "Diagnostic of *Mycoplasma hyopneumoniae*". J. Swine Health Prod. 12(5): 252-254, 2004.
- 86.** Thacker E. y Minion F.; "Diseases of Swine". Ames. Prensa de la Universidad Estatal de Iowa; 779-797, 2012.
- 87.** Topley W. y Wilson G.; "Microbiology and Microbial Infections". Rockville Pike, U.S.A.; 1990.
- 88.** Tully J.; "Cloning and filtration techniques for Mycoplasmas"; Estados Unidos; 1983.
- 89.** Tully J. y Whitcomb R.; "Minimal standards for description of new species of the class Mollicutes. Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology"; Estados Unidos; 1995.
- 90.** USDA, "Swine 2006 Part I: Reference of Swine Health and Management in the United States", Publication 475:1007, 2007.
- 91.** Valladares J., Angulo E., Barrientos B., Juárez D., y Lara A.; "Productividad y respuesta serológica de reproductoras con exposiciones vacunales y/o de campo a *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae*". ANECA; Mexico, 2002.
- 92.** Velazco J.; "Complejo Respiratorio Porcino". Laboratorios Virbac de México; 2012.

- 93.**White B. "PCR cloning protocols: from molecular cloning to genetic engineering. Methods in molecular biology". Totowa, New Jersey. 1997.
- 94.**Whitford H.; "Isolation of Mycoplasmas from Clinical Specimens". Mycoplasmosis in animals, Laboratory diagnosis. Iowa State University Associationn of Veterinary Laboratory. 12-14; 1994.
- 95.**Wolley, *et al.*; "Evaluation of clinical, histological and immunological changes and qPCR detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in tissues during the early stages of mycoplasmal pneumonia in pigs after experimental challenge with two fields isolates". Vet Microbiol. 161: 186-195. 2012.
- 96.**Zhang Q., Young T. y Ross R. "Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesion". Infect Immun. Mar; 63(3):1013-9; 2005.
- 97.**Zoetis; "A contemporary review of *Mycoplasma hyopneumoniae* control strategies". Zoetis Inc. 2016.

10. ANEXO

10.1 Medio de cultivo de Friis

Para preparar un medio de 165 ml.

| Reactivo | Cantidad |
|--------------------------|----------|
| Sales de Hank's A | 4 ml |
| Sales de Hank's B | 4 ml |
| PPLO | 0.55 gr |
| Infusión cerebro corazón | 0.55 gr |
| Agua deionizada | 117 ml |
| Extracto de levadura 25% | 6 ml |
| Rojo de fenol 0.5% | 0.45 ml |
| Suero de cerdo | 16.5 ml |
| Suero de equino | 16.5 ml |
| Penicilina | 1 ml |