



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**AISLAMIENTO Y TIPIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE *Mycoplasma*
spp EN MUESTRAS DE LECHE E HISOPOS NASALES DE
CAPRINOS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
PRESENTA**

ALEJANDRO JIMÉNEZ MENESES

Asesores:

DRA. ROSA ELENA MIRANDA MORALES

DR. FRANCISCO JOSE TRIGO TAVERA



MÉXICO D.F.

2011



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 Pedro Jiménez y Amelia Meneses por su apoyo, su comprensión y sobre todo por dejarme elegir libremente.

A mis Hermanos Beto, Jaime, Fer, Pedro, Juan, Leti y Lupe por su paciencia y por dejar los cimientos en los que estoy parado en este momento.

A mis sobrinos Pedrito, Paty, Robert, Víctor, Andrea, Frida, Jimena, al Max y Regina el futuro de nuestra familia.

A los amigos en especial a Ricardo, Edgar y Marco por apoyarme cuando se los pedí.

A todos aquellos que son o fueron parte de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por formarme y darme las herramientas necesarias para servir a México.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de ser parte de la más grande institución educativa en México.

Proyecto PAPIIT IN-215506.

Al H. Departamento de Microbiología e Inmunología por sus conocimientos y por dejarme conocer a los mejores maestros de la facultad.

Al laboratorio de Mycoplasma y a todos sus integrantes, en especial a Vero y Martha por su apoyo y amistad.

Dra Rosa Elena Miranda Morales por sus conocimientos y su amistad.

Dr. Francisco J. Trigo Tavera.

Dra Frida Salmerón Sosa del departamento de Genética y bioestadística.

De nuevo a mis padres y hermanos por creer en mí.

A ti por estar en las buenas y mucho menos en las malas, pero sobre todo por ser parte de mí vida y dejar que fuera parte de la tuya.

A mis compañeros y colegas de la facultad.

Y a todos aquellos que se me puedan pasar una disculpa pero saben muy bien que los quiero.

Y a Dios.

CONTENIDO

| | Página |
|--|--------|
| DEDICATORIA | II |
| AGRADECIMIENTOS | III |
| CONTENIDO | IV |
| ABREVIATURAS | VII |
| | |
| RESUMEN | 1 |
| | |
| 1.0 INTRODUCCIÓN | 2 |
| 1.1 Antecedentes de la producción caprina en México..... | 2 |
| 1.2 Especies del género <i>Mycoplasma</i> que afectan a los caprinos..... | 4 |
| 1.3 Antecedentes de la micoplasmosis caprina en México..... | 6 |
| 1.4 Taxonomía..... | 6 |
| 1.5 Transmisión y patogénesis..... | 8 |
| 1.5.1 Patogenia de los micoplasmas involucrados en la especie caprina..... | 9 |
| 1.6 Factores de virulencia..... | 11 |
| 1.7 Diagnóstico..... | 11 |
| 1.7.1 Selección y colección de la muestra..... | 11 |
| 1.7.2 Aislamiento de micoplasmas..... | 13 |

| | |
|--|-----------|
| 1.7.3 Método de identificación preliminar..... | 16 |
| 1.7.3.1 Cultivo puro..... | 16 |
| 1.7.3.2 Ausencia de pared celular..... | 16 |
| 1.7.3.3 Detección de formas L bacterianas..... | 16 |
| 1.7.3.4 Morfología de los colonias..... | 17 |
| 1.7.3.5 Dependencia de esteroides..... | 17 |
| 1.7.4 Métodos de identificación bioquímica..... | 18 |
| 1.7.4.1 Fermentación de la glucosa..... | 18 |
| 1.7.4.2Hidrólisis de la Arginina y Urea..... | 19 |
| 1.7.4.3 Actividad de la fosfatasa..... | 19 |
| 1.7.4.4 Reducción del tetrazolio..... | 20 |
| 1.7.4.5 Producción de películas y cristales..... | 21 |
| 1.7.4.6 Hidrólisis de la caseína..... | 21 |
| 1.7.5 Terapia..... | 22 |
| 1.7.6 Profilaxia..... | 23 |
| 2.0 HIPÓTESIS..... | 24 |
| 3.0 OBJETIVOS..... | 24 |
| 3.1 Objetivo general..... | 24 |
| 3.2 Objetivo específico..... | 24 |
| 4.0 MATERIAL Y METODOS..... | 25 |
| 4.1 Muestras..... | 25 |
| 4.1.2 Mixteca oaxaqueña..... | 28 |
| 4.1.3 Guanajuato | 29 |
| 4.2 Procesamiento de las muestras..... | 31 |

| | |
|--|----|
| 4.3 Aislamiento del género <i>Mycoplasma</i> | 32 |
| 4.4 Identificación Bioquímica..... | 32 |
| 4.5 Análisis estadístico..... | 33 |
| 5.0 RESULTADOS | 34 |
| 5.1 Identificación de colonias típicas de <i>Mycoplasma</i> | 34 |
| 5.2 Identificación de género..... | 35 |
| 5.3 Identificación bioquímica..... | 36 |
| 5.4 Granjas positivas al aislamiento de micoplasmas..... | 38 |
| 5.4.1 Granja San Pablo | 38 |
| 5.4.2 Granja San Miguel | 40 |
| 5.4.3 Análisis estadístico..... | 41 |
| 6.0 DISCUSIÓN | 42 |
| 6.1 Muestras con crecimiento positivo..... | 42 |
| 6.2 Morfología de las colonias..... | 43 |
| 6.3 Identificación Bioquímica..... | 45 |
| 6.4 Estudio comparativo de las dos granjas positivas al aislamiento de <i>Mycoplasma</i> | 48 |
| 6.4.1 Granja San Pablo (Gto1) Guanajuato..... | 48 |
| 6.4.2 Granja San Miguel (Gto2) Guanajuato..... | 49 |
| 6.5 Casos de animales con aparente enfermedad respiratoria y mastitis..... | 46 |
| 7.0 CONCLUSIONES | 55 |
| 8.0 REFERENCIA | 56 |
| 9.0 APÉNDICES | 62 |

ABREVIATURAS

| | |
|-------|--|
| (-) | Negativo |
| (+) | Positivo |
| µm | Micrómetros |
| µl | Microlitro |
| °C | Grados centígrados |
| ACC | Agalactia contagiosa caprina |
| DF | Distrito Federal |
| DNA | Deoxyribonucleic acid: Ácido desoxirribonucleico |
| FAO | Food and Agricultura Organization: Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación |
| FC | Fijación de complemento |
| Gto | Guanajuato |
| lts. | Litros |
| LC | Large colony: Colonia grande |
| LPSN | List of prokaryotic names with Standing in Nomenclature |
| M. | <i>Mycoplasma</i> |
| Mcc | <i>Mycoplasma capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i> |
| Mmc | <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>capri</i> |
| MmmLC | <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> LC |
| ml | Mililitros |
| Mm | Milímetros |

| | |
|---------|--|
| Mput | <i>Mycoplasma putrefaciens</i> |
| Oax | Oaxaca |
| OIE | Office International des Épizooties: Oficina Internacional de Epizootias |
| PCC | Pleuroneumonía contagiosa caprina |
| PCR | Polimerase chain reaction: Reacción en cadena de la polimerasa |
| pH | Potencial de hidrogeniones |
| PPLO | Pleuropneumoniae organism: Organismo de la pleuroneumonía |
| SAGARPA | Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación |
| SC | Small colony: Colonia pequeña |
| spp. | Sin especie definida |
| subsp. | Subespecie |

RESUMEN

JIMÉNEZ MENESES ALEJANDRO Aislamiento y tipificación bioquímica de *Mycoplasma* spp. de muestras de leche e hisopos nasales de caprinos (bajo la dirección de Dra. Rosa Elena Miranda Morales y Dr. Francisco José Trigo Tavera).

Con el fin de conocer si la población caprina de los municipios de Apaseo el Grande, Guanaguato y Huajuapán de León, Oaxaca, es afectada por micoplasmas del grupo *mycoides*. Enfermedad considerada de alto impacto económico y productivo, causante de problemas respiratorios y de mastitis. En este estudio, se colectaron 707 muestras, en dos muestreos, de hisopos nasales y leche de caprinos sanos y enfermos. De las muestras analizadas 29 (4.1%) fueron positivas al aislamiento de micoplasmas, de 23 cabras sanas y 6 de cabras enfermas. Se lograron aislar e identificar 43 colonias como *Mycoplasma* spp. con las pruebas filtrabilidad a 0.45 μ m, y sensibilidad a la digitonina. Las colonias fueron identificadas bioquímicamente con las pruebas fermentación de la glucosa y manosa, hidrólisis de la arginina y caseína, actividad de la fosfatasa, reducción del tetrazolio, y hemoadsorción, por lo que se identificaron a *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* en un 79.1% (34) y *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* en un 16.2% (7). Los resultados indican que la población en estudio ha tenido contacto con *Mycoplasma* spp del grupo *mycoides*, y que el 79.3% de los aislados provenían de muestras de leche y el 20.6% de hisopo nasal. Con el aislamiento del agente etiológico en muestras de caprinos podemos establecer que la población en estudio que presentaba mastitis y problemas respiratorios posiblemente es causa de la presencia de micoplasmas del grupo *mycoides*. Y por último destacar la presencia de portadores sanos como potenciales transmisores de la enfermedad.

1.0 INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes de la producción caprina en México.

La importancia del ganado caprino en el mundo está determinada por su valor económico y social, al localizar su producción en países con rentas bajas y/o en vías de desarrollo. Una muestra de ello se puede observar en los últimos censos, ya que la mayor cantidad de caprinos en el mundo se encuentran en países en desarrollo con un 94% del total, y el 7% corresponde a la población del continente americano. En América Latina, México se ubica en el segundo lugar con 8, 991, 752 caprinos, después de Brasil con 110,700,000 caprinos (FAO 2007). No obstante, existe un aumento en la producción de leche y carne en el país, con la participación más importante de los estados de Puebla con el 16% del inventario nacional caprino, seguido de Oaxaca con el 13%, Guerrero con el 7.5%, Coahuila con el 7.3%. San Luís Potosí con un 6.8%, y Guanajuato con el 6% (SAGARPA 2010 y OIEDRUS 2010).

El desarrollo de la caprinocultura en México se ve reflejado en los valores de la producción láctea de 165,197 litros en el 2008, el cual muestra un crecimiento del 3% con respecto a los años anteriores. Los principales estados productores de leche son Coahuila con un 35.2% de participación equivalente a 57,460 litros al año., Durango con el 22.9% (38,035lts.), Guanajuato con 14.4% (24,517lts.), y Chihuahua 5.7% (10,278lts.). Por su parte la producción de carne mostró un crecimiento de 3.28%, casi 43 mil toneladas totales. Los estados que concentran el 51.5% de producción de carne son Coahuila (12%), Oaxaca (10.5%), Puebla (8.5%), Guerrero (7.4%) y Zacatecas (7.4%) y San Luís Potosí (6.6%), (Cuadro 1.0) (SAGARPA 2010 y Gaitán. GJ., 2003).

Cuadro1. Producción de carne y leche en México en el 2008

| ESTADO | PRODUCCIÓN DE CARNE (toneladas) | PRUDUCCION DE LECHE (litros) |
|---------------|--|-------------------------------------|
| Coahuila | 5,283 | 57,460 |
| Durango | | 38,035 |
| Guanajuato | | 24,517 |
| Oaxaca | 4434 | |
| Puebla | 3,653 | |

El incremento considerable en la producción nacional de la caprinocultura obliga a un mayor estudio en las enfermedades que pueden afectar a esta producción, como también al enfoque en el diagnóstico de las enfermedades que tienen un importante impacto sobre su desarrollo y en la calidad de vida de los animales. Algunas de las enfermedades que tienen un alto impacto por las pérdidas ocasionadas, son la Artritis-encefalitis caprina, brucelosis, la micoplasmosis, neumonías, y mastitis, entre otras. Una de estas enfermedades a destacar es la micoplasmosis caprina, pues ha demostrado ser de alto impacto económico y productivo causante de neumonía, artritis, mastitis, septicemia, conjuntivitis y abortos, constatándolo en la preferencia que tiene este microorganismo por la superficie de la mucosa respiratoria, tracto urogenital, conjuntival, glándula mamaria y articulaciones (Egwu, GO *et al.*, 2000 y OIE 2004).

1.2 Especies del género *Mycoplasma* que afectan a los caprinos.

Los micoplasmas son microorganismos procariotes clasificados taxonómicamente como mollicutes (cuadro 2), que afectan a mamíferos, aves, reptiles, anfibios, peces, artrópodos y plantas. Son microorganismos con alta especificidad de especie animal (Razin S, *et al.*, 1998)

Cuadro 2 Taxonomía de los Mycoplasmas

| | |
|-----------|-------------------------|
| Clase | Mollicutes |
| Orden | Mycoplasmatales |
| Familia I | Mycoplasmataceae |
| Género | Mycoplasma |

Las especies más importantes del género *Mycoplasma* que afectan a los caprinos son *M. agalactiae*, *M. mycoides* subsp. *capri* (*M. mycoides* subsp. *mycoides* LC large colony), *M. capricolum*, *M. ovipneumoniae*, *M. arginini*, *M. putrefaciens* y *M. conjuntivae*; de las cuales, las especies *M. agalactiae*, *M. mycoides* subsp. *capri*, *M. capricolum* subsp. *capricolum* y *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* están involucradas en las dos enfermedades más importantes en los caprinos identificadas en Europa, África, Asia y Estados Unidos (Miranda MRE., 2003, Nicholas RAJ., 2002). Por lo cual la agalactia contagiosa caprina (ACC) y la pleuroneumonía contagiosa caprina (PCC), están consideradas en la lista de enfermedades de declaración obligatoria por la Organización Mundial de la Salud Animal en el 2006 (OIE). En 1999 la Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación (SAGARPA) colocó en el grupo 1 de las enfermedades exóticas de reporte obligatorio e importancia socioeconómica, alta morbilidad y altamente infecciosas a la PCC y la ACC (SAGARPA., 2007 y OIE., 2006).

La Agalactia Contagiosa Caprina (ACC) ocasionada por *M. agalactiae*, que también involucra a *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC, puede ocasionar una morbilidad hasta del 100% y mortalidad del 40 al 90% (Miranda MRE., 2003). Egwu G.O. *et al.*, (2000), afirman que los problemas agudos se encuentran en los animales más jóvenes. La ACC ocasiona una pérdida anual de casi 30 millones de dólares en varios países de Europa y el Mediterráneo como resultado de la baja producción láctea, la mortalidad, la neumonía y los abortos ocurridos (Nicholas RAJ., 2002). *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC (*M. mycoides* subsp. *capri*) está asociada a ACC y PCC, que principalmente afectan a los rebaños de aptitud láctea, provoca una reducción de la producción de leche, septicemia, poliartritis en cabras jóvenes, así como neumonía, queratoconjuntivitis y mastitis; se ha observado que la infección respiratoria se presenta como cuadro principal de la enfermedad (Hailu Kinde *et al.*, 1994).

La pleuroneumonía contagiosa caprina (PCC) es causada por *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*; es una de las micoplasmosis más severas en donde se han reportado la mayor pérdida de cabras (OIE 2004, Wesonga HO. *et al.*, 2004), con alta morbilidad y mortalidad, se caracteriza por una fiebre extrema (41 – 43 °C), afectando a los animales de cualquier edad y ambos sexos, produciendo los mismos signos clínicos que se mencionaron anteriormente pero con cuadros respiratorios más severos (Nicholas RAJ., 2002).

1.3 Antecedentes de la micoplasmosis caprina en México.

La micoplasmosis caprina fue descrita por primera vez en el estado de Puebla (Aluja A.S., 1964) como una pleuroneumonía por los hallazgos histopatológicos del tejido pulmonar y lesiones en otros órganos; Ciprian–Carrasco J.A. (1979) reportaron la identificación bioquímica y serológica de *Mycoplasma arginini* y *Mycoplasma ovipneumoniae* a partir de pulmones neumónicos de ovinos y caprinos del rastro de la ciudad de México. En el 2003 en el estado de Durango se aislaron e identificaron de un brote de neumonía en cabras a *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (Hernández AL. *et al.*, 2006), Otero, N.J. *et al.*, 2004 aislaron a partir de macerados de ácaros recolectados del conducto auditivo a varias especies de micoplasmas, como son a *M. conjunctivae*, *M. putrefaciens*, *M. adleri*, *M. cottewii* y *M. yeatsii* en cabras de rastro. Por último, en el 2006 Corona-Vargas J.L., estandarizó las pruebas de FC y Aglutinación indirecta con sueros provenientes de siete estados de la republica mexicana resultaron con alta sensibilidad a la prueba de fijación de complemento para el grupo mycoides positivos en un porcentaje alto. Estos datos sugieren la presencia de la micoplasmosis en la población caprina de nuestro país, por lo tanto se debe enfatizar en la importancia de un buen diagnostico y un control de la micoplasmosis.

1.4 Taxonomía.

El termino *Mycoplasma*, fue utilizado por primera vez por A.B. Frank en 1889, por la forma aparente o similar a los hongos que atacaban a las plantas. Es una bacteria fenotípicamente diferente a otras por su tamaño pequeño, son filtrables en membranas de

0.22-0.45 μm , carecen de pared celular lo cual los hace resistentes a los β -lactámicos y son sensibles al choque osmótico y al efecto de los detergentes. Estas características justifican que estén dentro de la clase llamada **Mollicutes** (molis suave, cutis piel, en latín), y sus propiedades lo distinguen dentro de un taxón diferente. Se distinguen por su morfología de huevo frito y sus altos requerimientos nutricionales de esteroides y aminoácidos exógenos; con requerimiento para su incubación de 5-10% de CO_2 y en atmósfera de humedad (Conrad J. *et al.*, 1973 y Whitford HW., 1994).

Durante su evolución los micoplasmas han perdido aparentemente todos los genes involucrados en la biosíntesis de aminoácidos y por ello dependen completamente de los aminoácidos esenciales del huésped; su requerimiento de esteroides, particularmente el colesterol, ha sido importante para su clasificación taxonómica, distinguiendo al grupo de los no dependientes de esteroides, particularmente los *Acholeplasmatales*, y los dependientes de esteroides, pertenecientes a los *Mycoplasmatales*.

Otra de las clasificaciones de los mollicutes es en organismos helicoidales y no helicoidales. En la forma helicoidal se encuentran el orden *Spiroplasmatales* que infectan plantas y artrópodos. Dentro de los organismos no helicoidales están el orden *Acholeplasmatales* y los *Mycoplasmatales*, familia *Mycoplasmataceae*, que incluye al género *Mycoplasma* y al género *Ureaplasma*, este último se distingue por la presencia de la enzima ureasa, que en el caso de los micoplasmas está ausente (Miranda MRE., 2003). Para el género *Mycoplasma*, List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN)

reconoce 122 especies, siendo aproximadamente 85 las que afectan al hombre y a los animales.

1.5 Transmisión y patogénesis.

En la ACC, los focos de infección se dan por uno o varios agentes o vectores, por contacto directo o inhalación de aerosoles. Los aerosoles, el alimento contaminado y el contacto directo con los animales enfermos son particularmente la forma en que se contrae la infección respiratoria en los rebaños. La secreción de leche, secreciones vaginales, orales y nasales, orina y heces de animales infectados, es la principal vía de infección horizontal y por lo tanto la primera forma de contagio en los animales pequeños (Egwu G.O., *et al*, 2000 y Madanat A. *et al.*, 2001). La infección de la glándula mamaria se magnifica ante factores relacionados con el manejo inadecuado del ordeño.

En el caso de la PCC, no se ha evidenciado que exista una infección indirecta, sino por el contrario, el animal debe de estar expuesto directamente con la cabra enferma. El periodo de incubación es de 5 a 28 días, el primer signo es el padecimiento de una fiebre constante (41° C), con una respiración acelerada acompañada de episodios violentos de estertores. Se demostró que los micoplasmas se diseminan por la circulación a los órganos diana, como son la glándula mamaria, ojos, linfonodos, articulaciones y tendones, los cuales son alterados por la inflamación (Nicholas RAJ. 2002).

1.5.1 Patogenia de los micoplasmas involucrados en la especie caprina.

***Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* (Mcc).**

Mycoplasma capricolum subsp. *capricolum*, es el principal patógeno en cabras, ocasionalmente en borregos y rumiantes silvestres. Causante de artritis con una alta mortalidad y morbilidad. La infección culmina con una septicemia o neumonía, con una hipertermia de 41°C. La pirexia es de corta duración, aparentemente más grave en los animales pequeños, y en pocos casos progresivos. Se ha sugerido que la prevalencia de la enfermedad e infección coincide con el estrés por el manejo en los animales gestantes y en parto. Mcc tiene mayor predisposición por la glándula mamaria, donde induce una mastitis con hipertrofia marcada y consecutivamente a su cronicidad, dando como resultado la atrofia del órgano. Existe una marcada artritis con una acumulación de fluido articular. Las complicaciones viscerales llevan a una inflamación del músculo cardíaco, en el peritoneo e hígado. Otros síntomas asociados a Mcc es la queratoconjuntivitis, abortos y vulvo-vaginitis granular (De la Fe C. *et al.*, 2007 y Guiadini, N.D. *et al.*, 2008).

***Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. (Mmc).**

Mycoplasma mycoides subsp. *capri*, anteriormente clasificado como *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC (Manso-Silván L. *et al* 2009), muestra signología clínica similar a Mcc, la primera causa de enfermedad por micoplasmosis en caprinos. Las lesiones más consistentes por Mmc incluyen una bronconeumonía, septicemia e hipertrofia de los linfonodos palpables, seguidos de una mastitis y artritis (Egwu, GO. *et al.*, 2000). Los diferentes signos de Mmc han sido también asociados a la enfermedad Artritis Encefalitis Caprina (AEC) en

cabras y ovinos. Siendo los caprinos más susceptibles a Mmc con los clásicos signos de una Pleuroneumonía Contagiosa Caprina (PCC); neumonía, artritis y septicemia. La micoplasmosis por Mmc ha mostrado mayor tropismo por las lesiones respiratorias que otros micoplasmas que afectan a los caprinos.

***Mycoplasma agalactiae* (Ma).**

Micoplasma involucrado en la enfermedad llamada Agalactia contagiosa (AC), altamente infecciosa en cabras y borregos, incluida en la lista de enfermedades de reporte obligatorio en la OIE; usualmente se manifiesta con una mastitis. En hembras que no están en lactación, en machos y animales jóvenes suele causar artritis, queratoconjuntivitis y problemas respiratorios. En condiciones naturales la forma más común de entrada de *M. agalactiae* es oral, respiratoria o mamaria. La infección por medio de la circulación sanguínea llega a su órgano blanco como es el caso de la glándula mamaria, la mucosa conjuntival, los linfonodos, articulaciones y tendones, terminando con una severa inflamación de ellos (Madanat, A. *et al.*, 2001).

***Mycoplasma putrefaciens* (Mput).**

La descripción de la infección relacionada con Mput ocasiona como primer signo la mastitis necrosante, otros signos son la artritis en animales adultos y septicemia en animales jóvenes, lo que la distingue de los demás micoplasmas del grupo *mycoides* (Whitford, HW., *et al.*, 1994).

1.6 Factores de virulencia.

Una característica muy importante de estos microorganismos es su alta especificidad por el hospedador. A pesar de presentar diferentes mecanismos de virulencia (adhesión, cápsula de galactános, producción de peróxido de hidrógeno y radicales libres, etc.). Los micoplasmas no se consideran altamente patógenos. Suelen provocar enfermedades subagudas y crónicas, siendo muy importante los portadores sanos en su epidemiología (Shlomo Rotten., 2003).

Algunos de los factores que desencadenan la enfermedad son el manejo inadecuado de los animales que conlleva a un estrés continuo y por lo tanto una inmunodepresión, ya que por sí solo los micoplasmas se consideran parásitos, porque usualmente viven en equilibrio con el huésped.

1.7 Diagnóstico.

El diagnóstico de la micoplasmosis caprina se puede realizar a partir del aislamiento e identificación bioquímica; proceso que es confiable y práctico para establecer el agente etiológico.

1.7.1 Selección y colección de la muestra.

Para poder confirmar que la signología clínica pertenece o es provocada por una bacteria del género *Mycoplasma* se debe aislar al agente, por lo tanto es recomendable tomar muestras de exudado nasal o secreción, muestras de leche de tanque o directa de la ubre, fluido articular e hisopos oculares. Para la toma de la muestra se necesita material previamente esterilizado hisopos, etc., y medio de transporte Hayflick (OIE. 2004).

La recolección de la leche de la glándula mamaria se realiza como lo indica el National Mastitis Council (1999) para muestras de leche en bovino. Como primer paso se debe lavar el área de la ubre y el pezón; posteriormente se debe desinfectar con alcohol al 70% para obtener una recolección lo más asépticamente con el fin de evitar la contaminación de la muestra por microorganismo saprofitos. Se deben utilizar frascos estériles con capacidad mínima de 15 ml. Se recomienda desechar los primeros chorros de leche para eliminar los microorganismos presentes en el canal del pezón. La cantidad mínima que se debe tomar es de 3-4 ml. para el estudio bacteriológico. Después de recoger las muestras, éstas se deben mantener en refrigeración a una temperatura de 4 °C para ser transportadas al laboratorio. Se debe cultivar inmediatamente o mantener en refrigeración a 4 - 5 °C por una semana o en congelación a -20 °C por un periodo de un mes.

La forma en que se recomienda tomar las muestras de secreciones nasales y oculares en animales vivos es por medio de hisopos estériles y en el caso de muestras de aspirado articular con jeringa estéril, se necesita utilizar un medio de transporte para depositar las muestras. La OIE (2005) recomienda utilizar como medio de transporte Hayflick o que utilicen como medio base PPLO en una cantidad de 2 a 3 ml de medio de cultivo. A la necropsia de animales enfermos se recomienda tomar muestras de linfonodos regionales, fluido articular, tejido pulmonar, fluido del pericardio y pleural. Para esto se recomienda descontaminar la superficie del tejido por medio de una espátula caliente o por flameado y macerarlo con medio de cultivo, usando 9 ml de medio por 1gr de tejido La transportación de las muestras debe ser rápida y en refrigeración o en congelación sí es por un periodo prolongado.

Los micoplasmas son microorganismo muy sensibles, por lo que requieren un cuidado especial para garantizar su viabilidad. La contaminación bacteriana o fúngica, los cambios de temperatura y pH son algunos factores que pueden alterar su desarrollo (Whitford, H.W. *et al.*, 1994).

1.7.2 Aislamiento de micoplasmas.

El medio de cultivo más utilizado para el aislamiento de micoplasmas está basado en la formulación desarrollada originalmente por Edward (1956); contiene una base de infusión cerebro y corazón de bovino y peptona, denominado PPLO (Pleuroneumonía Like organisms), se le agrega extracto fresco de levadura y un 20% de suero de caballo, medio base para el aislamiento de los géneros *Mycoplasma* y *Acholeplasma* de origen humano y animal.

El suero agregado al medio base proporciona la fuente de lípidos, esteroides y de otros nutrientes como las proteínas, azúcares y urea. La necesidad de alto contenido de esteroides se le atribuye a la ausencia de pared celular, ya que le proporciona resistencia osmótica; se puede utilizar suero de diferentes especies animales en una concentración de 5- 20%, que estén libres de inhibidores como el complemento o anticuerpos contra los micoplasmas, para esto se debe inactivar el complemento por medio de calor a 56°C durante 30 minutos. Los micoplasmas necesitan factores de crecimiento como el extracto de levadura, vitaminas del grupo B y aminoácidos como la glutamina, aspargina y arginina y proteínas. Algunos autores han sugerido que el suero de origen animal se puede sustituir por yema de huevo (Miranda, MRE., 2003).

El conocimiento de las propiedades bioquímicas de los micoplasmas se ha basado muy especialmente en el comportamiento de estos microorganismos frente a los carbohidratos. La glucosa y urea, pueden ser añadidas como fuente de energía, en cuyo caso se recomienda agregar rojo de fenol al 1% como indicador de pH para detectar los mínimos cambios de color. Los micoplasmas pueden provocar variaciones en el pH por la utilización de los carbohidratos durante su crecimiento, que ocasiona posibles efectos tóxicos o inhibitorios. Una acidificación del medio por una fuerte fermentación de los micoplasmas detiene el crecimiento y es seguido por una muerte rápida del microorganismo. En el caso de los micoplasmas no fermentativos, que utilizan urea o arginina, se corre el riesgo de que el pH se incremente excesivamente. Los valores de pH adecuados para el crecimiento de los micoplasmas se encuentran entre 7 y 8, si el pH desciende por debajo de 6.5 afecta la viabilidad del micoplasma.

Algunas especies de micoplasmas son difíciles de aislar por lo consiguiente necesitan mayores nutrientes en el medio de cultivo, sustancias como el hidrolizado de lactoalbúmina, nicotinamida, L-cisteína, suero fetal de ternera, suero de cerdo y piruvato de sodio.

Para evitar el desarrollo de bacterias en el medio de cultivo se adicionan inhibidores bacterianos como el acetato de talio y β -lactámicos. Los micoplasmas son resistentes a los β -lactámicos (penicilinas y cefalosporinas) que por su mecanismo de acción actúan en la síntesis de la pared celular. El acetato de talio inhibe el crecimiento de bacterias Gram negativas. Sin embargo hay ciertas especies que son susceptibles a estos inhibidores; por lo tanto es recomendable tomar la muestra lo más asépticamente posible (Miranda, MRE., 2003).

Whitford H.W (1994) describe la técnica para el aislamiento del género *Mycoplasma* en la inoculación directa a medio líquido, realizando de 4 a 10 diluciones de la muestra para reducir la contaminación por otras bacterias o sustancias inhibitorias, o bien sembrar directamente la muestra en medio sólido o en medio líquido. Los cultivos se incuban a 37°C, en el caso del medio sólido se incuban en una atmósfera de 5 a 10% de CO₂ en un ambiente húmedo y en una atmósfera aeróbica para el medio líquido. El desarrollo del microorganismo se puede observar en medio líquido por una turbidez o cambio de pH. En el medio sólido se recomienda un periodo de 3 días para observar si existe crecimiento. El desarrollo de los micoplasmas depende de la especie involucrada. El desarrollo que se espera en medio sólido se conoce como morfología típica de huevo frito en un periodo aproximado de 14 días, si no hay crecimiento se puede descartar esa muestra como positiva.

1.7.3 Métodos de identificación preliminar.

1.7.3.1 Cultivo puro.

Es necesario obtener un cultivo puro de micoplasmas antes de realizar cualquier método de identificación. Por medio de la técnica de clonación triple se elige una colonia similar ya que en un solo medio se pueden encontrar distintas colonias, y por lo tanto causan problemas en la identificación por medio de pruebas secundarias ya sean bioquímicas, serológicas u otras. Es necesario filtrar en membrana de 0.22-0.45 μm en medio líquido para retener las bacterias que se puedan encontrar y que los micoplasmas pasen a través del filtro. Con esta técnica se logra tener un cultivo puro de una colonia de micoplasma (Miranda, MRE., 2003).

1.7.3.2 Ausencia de pared celular.

La ausencia de pared celular es evidente al observar las colonias por el microscopio electrónico, pero no es práctico para la mayoría de los laboratorios. Una alternativa es examinar el cultivo líquido en un microscopio de contraste de fase o de campo oscuro que demuestra el pleomorfismo de los micoplasmas (Miranda, MRE., 2003).

1.7.3.3 Detección de formas L bacterianas.

Un cultivo sospechoso de bacterias de forma L o de micoplasmas, es confirmado al realizar cultivos líquidos y sólidos libres de inhibidores (β -lactámicos, acetato de talio) para confirmar o descartar si existen reversión de formas L a formas bacterianas que presenten pared celular (Miranda, MRE., 2003).

1.7.3.4 Morfología de las colonias.

La mayoría de las colonias de micoplasmas presentan la típica forma de “huevo frito” en medio sólido, dependiendo también del medio y las condiciones de incubación. La forma central es densa y opaca con crecimiento profundo en el grosor del agar y una zona translúcida que se desarrolla en la superficie. La morfología varía según el medio que se utilice, la especie de micoplasma, el número de pases y la edad del cultivo.

En pases tempranos, muchas especies de micoplasmas, incluyendo *M. capricolum* subsp. *capricolum* (Mcc) producen colonias con morfologías pequeñas e irregulares. Este efecto es asociado con la sustitución de algún elemento del medio. Mientras más pases se realizan las colonias muestran una morfología definida, excepto *M. ovipneumoniae* que se presenta como un punto central. Las colonias de *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC (MmmLC) y Mcc se presentan como colonias grandes de hasta 3mm de diámetro (Whitford, H.W. *et al.*, 1994).

1.7.3.5 Dependencia de esteroides.

El requerimiento de esteroides separa a los *Acholeplasma* no dependientes de esteroides, de los *Mycoplasma*, *Ureaplasma* y *Spiroplasma* dependientes de esteroides. Los micoplasmas incorporan gran cantidad de esteroides en su membrana, por ello son sensibles a la presencia de la digitonina, provocando la lisis bacteriana al producir la desorganización de la membrana. La prueba de la digitonina como método indirecto se realiza para valorar el requerimiento de esteroides de los Mollicutes, y consiste en sembrar en el medio sólido el microorganismo y depositar discos de 6 mm impregnados de una solución de digitonina al 1.5%. Después de la incubación una reacción positiva presenta una zona clara de inhibición

de 4-5 mm indicativo de una cepa de micoplasmas. Los *Acholeplasmas* presentan una reacción negativa, sin presentar halo de inhibición, o bien presentan halos de inhibición de 1-2 mm (Miranda, MRE., 2003).

1.7.4 Métodos de identificación bioquímica.

Las siguientes pruebas bioquímicas se han probado como adecuadas y prioritarias para la caracterización de la mayor parte de los micoplasmas. Es necesario consultar al Subcomité sobre la Taxonomía de Mycoplasmatales con el fin de utilizar las pruebas bioquímicas recomendadas para lograr una adecuada identificación.

1.7.4.1 Fermentación de la glucosa.

Varias técnicas descritas para determinar la fermentación de la glucosa en los micoplasmas incluyen la reacción de la glucosa oxidasa. La determinación de productos ácidos derivados de la fermentación y la determinación de la actividad de la enzima hexoquinasa es evidente, con la simple prueba basada en la determinación de la disminución del pH en el medio de crecimiento.

Este método consiste en agregar al medio de cultivo 1% de glucosa y rojo de fenol al 0.5% como indicador de pH. Para la apropiada interpretación de esta prueba se inocula un tubo con 1 ml de cultivo purificado y otro tubo sin inocular, se incuban a 37°C hasta 2 semanas. Una reacción positiva es cuando desciende el pH 0.5 unidades. Este ligero cambio es comprobado al comparar el tubo de glucosa inoculado con el que no tiene cultivo que sirve

de referencia que van de 6.0-8.2 de pH; además de compararlos con controles positivos a la glucosa (OIE., 2004 y Whitford, H.W. *et al.*, 1994).

1.7.4.2 Hidrólisis de la Arginina y Urea.

Se reemplaza la glucosa del medio por arginina al 0.2% o urea al 1%, y se ajusta el pH a 7. También se debe utilizar para esta prueba controles de medios como para la fermentación de la glucosa. En un tubo con medio líquido con arginina o urea se inocula 0.05 ml de un cultivo de 24 hrs y se incuba a 37°C. Una reacción positiva se identifica por el cambio de pH a alcalino (rojo). Posteriormente se subcultiva sobre medio sólido para confirmar el crecimiento de micoplasmas (Miranda, MRE., 2003 y Whitford, H.W. *et al.*, 1994).

La hidrólisis de la arginina se produce por la acción enzimática de la arginina desaminasa, la ornitina transcarbamilasa y la carbamato quinasa. Algunas de las especies positivas a la hidrólisis de la arginina son *M. arthritidis*, *M. gallinarum*, Taxón G y Taxón U. Las especies de micoplasmas negativas a la hidrólisis de la arginina son: *M. agalactiae*, *M. mycoides* subsp. *capri*, *M. putrefaciens* y *M. bovis*. La hidrólisis de la arginina también se puede determinar por la actividad de la enzima arginina desaminasa con formación de citrulina; prueba cuantificada por espectrofotometría.

1.7.4.3 Actividad de la fosfatasa.

La actividad de la fosfatasa se basa en la hidrólisis de la fosfatasa sobre la fenolftaleina difosfato con la liberación de la fenolftaleina del medio de cultivo. Después de la incubación a 37°C durante 3, 7 y 14 días, la fenolftaleina liberada es detectada en el medio

de cultivo sólido cuando se observa una coloración roja al agregar álcalis (pH 9-10) como el 5N NaOH sobre las colonias desarrolladas. Una prueba positiva se indica al aparecer una coloración roja en el medio. Una prueba negativa es indicada por un leve cambio o nada de coloración. Esta reacción se presenta en un elevado porcentaje de especies de micoplasmas y dentro del grupo *mycoides* sólo dos especies presentan reacción positiva a la prueba (*M. capricolum* subsp. *capricolum* y *M. putrefaciens*); (Miranda, MRE., 2003 y Whitford, H.W. *et al.*,1994).

1.7.4.4 Reducción del tetrazolio.

Esta prueba demuestra la actividad de los micoplasmas al reducir el 2,3,5-tetrazolium y podemos observarla en la mayoría de las especies de micoplasmas. La actividad reductora (aceptor de electrones) se puede demostrar agregando 0.2% de 2,3,5-trifenil-tetrazolium tanto en el medio líquido como en el sólido. En el medio líquido se inoculan dos tubos, uno se incuba en aerobiosis y el otro en anaerobiosis a la temperatura de 37°C durante dos semanas. Para evitar variabilidad en los resultados se debe controlar en el inóculo la densidad bacteriana. Una reacción positiva es cuando se observa un halo rojizo en uno o ambos tubos. La reacción en el medio sólido es más rápida y no se necesita controlar la densidad bacteriana. Un resultado positivo a la prueba se observa inicialmente por una coloración rosa y posteriormente se observa una coloración roja púrpura. La mayoría de las especies del grupo *Mycoides* presentan reacción positiva a esta prueba (Miranda, MRE., 2003 y Whitford, H.W. *et al.*, 1994).

1.7.4.5 Producción de películas y cristales.

La producción de películas y cristales es característica de algunos micoplasmas el cual se puede observar en el crecimiento de colonias en medio sólido que contengan 20% de suero de equino. Una película de apariencia rugosa que se observa en la superficie del medio compuesta de colesterol y fosfolípidos. Los pequeños cristales que aparecen alrededor de la colonia se atribuyen a los depósitos de sales de calcio y magnesio procedentes de los ácidos grasos que son liberados por la actividad lipolítica de los micoplasmas.

El medio sólido es inoculado a 37 °C y el resultado puede observarse en el microscopio a partir de las 24 hrs de incubación. Las placas no deben incubarse por más de 2 semanas porque esto puede dar falsos positivos (Miranda, MRE., 2003).

1.7.4.6 Hidrólisis de la caseína.

La actividad proteolítica es útil para la caracterización de un limitado número de micoplasmas. Para esta prueba se necesita leche descremada diluida en agua destilada y estéril, de esta dilución se agrega una parte por 7 partes de medio de cultivo, se siembra el medio sólido con un cultivo de micoplasmas y se incuba. Una reacción positiva se observa por una zona clara alrededor de las colonias. La especie *Mmc* reacciona positivamente; *M. agalactiae*, *Mput* y *M. alkalescens* presenta una reacción negativa (Miranda, MRE., 2003 y Whitford, H.W. *et al.*, 1994).

1.7.5 Terapia

Los primeros medicamentos que se usaban en el tratamiento de la agalactia contagiosa (AC) consistían en componentes arsenicales como las sales de zinc de acetarsol y el sodio. Todos los antibióticos a utilizar deben poseer ciertas características para ser efectivos, incluyendo una adecuada diseminación en la sangre y la glándula mamaria, y una mínima concentración inhibitoria (MIC), seguida de una administración parenteral o intramamaria. Algunos antibióticos que se describen para el control y tratamiento de la AC y la PCC, incluyen a las tetraciclinas, tiamulinas, fluoroquinolonas y los macrólidos. La terapia de antibióticos generalmente es inefectiva para el control de la AC, solo tiende a reducir los signos clínicos, promoviendo un buen estado de salud, reducir la mortalidad y posiblemente lograr recuperar la producción láctea. Estudios *in vitro* han demostrado una aceptable sensibilidad solo a las fluoroquinolonas, las tetraciclinas y los macrólidos. También hay evidencia de una alta resistencia al ácido nalidíxico, gentamicina, estreptomycinina y espectinomycinina (Antunes, NT. *et al.*, 2007). Cabe recordar que la resistencia a algunos antibióticos es debido a que la AC envuelve a diferentes especies de micoplasmas.

Igual que otras enfermedades causadas por micoplasmas, la Pleuroneumonía contagiosa caprina (PCC), es generalmente refractaria a diferentes antibióticos comúnmente utilizados. Solo las tetraciclinas y la tilmicosina son seguras en diferentes infecciones. La efectividad de los antibióticos también depende de la ubicación de la infección y la especie involucrada, por lo que existen antibióticos para tratar la micoplasmosis a nivel de articulaciones, a nivel de tracto respiratorio y mamario. Otro aspecto que se debe tomar en cuenta es que el tratamiento puede encubrir a animales portadores porque el

microorganismo se sigue eliminando aunque no se observe sintomatología. Las cabras en lactación reciben la mayor parte de los tratamientos de antibióticos masivos, en consecuencia los productos lácteos pueden verse alterados al contener residuos de sustancias antimicrobianas y se considera un importante factor de deterioro de la calidad del producto final, así como un riesgo para la salud pública (Nicholas, RAJ. 2002).

1.7.6 Profilaxia.

Se han sugerido diferentes vacunas o estrategias de vacunación. Incluyen desde las vacunas inactivadas que generalmente tienen una corta vida o protección, las vacunas vivas atenuadas que requieren elevadas dosis debido a que la protección dura pocos meses.

Existen protocolos de vacunación para la prevención de la AC y la PCC indicada para aquellos países con una gran prevalencia de la enfermedad. La vacuna inactivada para *Mycoplasma agalactiae* se aplica tres veces por año durante 6 años, no previene la enfermedad por una infección natural, y no reduce la excreción del microorganismo. Las vacunas atenuadas han demostrado mayor protección, pero producen una infección pasajera, ésta se puede eliminar por leche, por lo que no se debe aplicar a animales en lactación. Recientemente se han probado vacunas inactivadas de Mmc en el Mediterráneo, con formalina y emulsificadas con aceite mineral y sorbitol, dando protección de hasta 6 semanas en los animales jóvenes (OIE. 2004).

2.0 HIPÓTESIS.

Mycoplasma spp. se detectará en un 10% del total de muestras obtenidas de los municipios de Apaseo el Grande, Guanajuato y Huajuapán de León, Oaxaca; las especies identificadas corresponderán al grupo *mycoides*, responsables de la micoplasmosis caprina.

3.0 OBJETIVOS.

3.1 Objetivo general.

Determinar las especies de micoplasma que se encuentran en muestras de leche e hisopos nasales de cabras productoras de leche, por medio de la identificación bioquímica para establecer la presencia de micoplasmas del grupo *mycoides* en los Municipios de Apaseo el Grande Guanajuato. y Huajuapán de León Oaxaca.

3.2 Objetivos específicos

- 1) Aislamiento del género *Mycoplasma spp.* de muestras de leche e hisopos nasales de caprinos.
- 2) Identificación bioquímica de las especies de micoplasmas que afectan a los caprinos dentro del grupo denominado *mycoides*.
- 3) Identificar a las zonas con alto porcentaje de aislamientos relacionados con micoplasmas del grupo *mycoides* en cabras sanas y enfermas.

4.0 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Muestras

Se realizaron dos muestreos en las zonas de estudio localizadas en Huajuapán de León, Oaxaca y Apaseo el Grande, Guanajuato. Se colectó un total de 707 muestras de hisopo nasal y de muestras de leche. Para calcular el tamaño de la muestra por zona se aplicó la fórmula de población finita, la cual permite tomar una muestra idónea en una población estimada:

$$n = \frac{N * Z_{\alpha}^2 * p * q}{d^2 * (N - 1) + Z_{\alpha}^2 * p * q}$$

donde:

N = Total de la población

Z_α = 1.962 (seguridad del 95%)

p = proporción esperada (en este caso 5% = 0.05)

q = 1 – p (en este caso 1-0.05 = 0.95)

d = precisión

De los 8 principales caprinocultores de la zona de Apaseo el Grande Guanajuato se estimó una población total de 1388 vientres, al aplicar la formula se obtuvo una muestra aproximada de 177; y en la zona de Oaxaca con una población aproximada de 646 vientres, el resultado fue de 155 muestras a recolectar. El número de muestras obtenidas fue superior en el caso del municipio Apaseo el Grande, ya que se tomaron en cuenta factores como el estado de las granjas y la oportunidad de tomar las muestra dentro de las dos etapas del muestreo. Se trabajaron 402 muestras de hisopos nasales y 305 muestras de leche, de rebaños ubicados en la Mixteca oaxaqueña y Guanajuato (Cuadro 3).



Figura 1. Muestras de hisopo nasal y leche directa.

Cuadro 3. Características de las zonas de muestreo.

| Lugar | Hisopo nasal | Leche | Grupo genético | Tipo de producción | Total |
|--------------------------|---------------------|--------------|-------------------------------------|---------------------------|--------------|
| Mixteca oaxaqueña | 81 | 69 | Saanen, Alpina francesa | Semitecnificado | |
| Guanajuato | 321 | 236 | Saanen, Alpina francesa, Toggenburg | Tecnificada | |
| Total | 402 | 305 | | | 707 |

Para la obtención de la muestra nasal se utilizaron hisopos estériles y como medio de transporte el medio de Hayflick; los hisopos fueron rotados en la cavidad nasal y se depositaron en tubos con 2 ml. del medio Hayflick. En el caso de las muestras de leche fueron tomadas como lo indica el National Mastitis Council 1999, de las dos ubres previamente desinfectadas se colectaron un aproximado de 10 ml en frascos estériles. Todas las muestras se transportaron en refrigeración a 4 °C., hasta su llegada al laboratorio y almacenadas a 4 °C hasta su procesamiento. En un intervalo aproximado de 6 meses se realizaron dos muestreos en las mismas zonas (fig1).

4.1.2 Mixteca oaxaqueña.

En 9 rebaños de la zona de la Mixteca Oaxaqueña, que en su mayoría se encuentran dentro del municipio de Huajuapán de León., zona de clima semi cálido seco con suelos pobres por problemas graves de erosión, orografía accidentada y considerada como una de las más marginadas del país. Entre las principales actividades económicas de la zona se encuentra la caprinocultura. De las 9 zonas de muestreo, la principal actividad zootécnica de los rebaños caprinos es la producción de leche por ordeño mecánico, predominando el grupo genético Saanen. El tipo de producción de la granja se define como semi-intensivo, pastoreo por las mañanas y encierro en las tardes con una suplementación en su dieta (Santo I.- Arbiza Aguirre 1986); su principal producción es leche para elaboración de quesos (Cuadro 3). Los rebaños tenían antecedentes de enfermedad respiratoria por temporadas y mastitis subclínica, así como opacidad de córnea y artritis marcada, se desconoce como se diagnosticó la AEC (Artritis encefalitis caprina). A la mayoría de los 9 rebaños se les realizaron dos muestreos, que fueron identificados como lo muestra el cuadro 3.1.

Cuadro 3.1 Identificación de los rebaños y el número de muestreos realizados en Oaxaca.

| Lugar | Identificación | Muestreos realizados | Promedio de vientres | Antecedentes clínicos | Número de muestras | % |
|------------------|----------------|----------------------|----------------------|-------------------------------------|--------------------|------|
| Ayuquilan | Oax1 | 1 | 110 | MS, ER, QC, AR | 8 | 7.3 |
| Huacapan | Oax2 | 1 | 59 | | 14 | 23.7 |
| La luz de Juárez | Oax3 | 2 | 60 | | 33 | 55 |
| Marizcala | Oax4 | 2 | 100 | | 21 | 21 |
| San Nicolas | Oax5 | 2 | 77 | | 14 | 18.2 |
| Tlaxihtaquilla | Oax6 | 1 | 50 | | 8 | 16 |
| Yozocuta | Oax7 | 2 | 75 | | 33 | 44 |
| Zapotitlan | Oax8 | 1 | 60 | | 9 | 15 |
| Zocotiaca | Oax9 | 2 | 55 | | 10 | 18.2 |
| TOTAL | | | | | 150 | |

ER: enfermedad respiratoria; MS: mastitis subclínica; AR: artritis; QC: queratoconjuntivitis;
Muestreos realizados: 1 (un muestreo hecho); 2 (dos muestreos hechos)

4.1.3 Guanajuato.

La zona de Apaseo el Grande presenta un clima templado todo el año, con una temperatura máxima de 37.1°C y una mínima de 0.9°C; con cría de ganado bovino, porcino, ovino y caprino (10 mil 687 cabezas). De esta zona de estudio se tomaron muestras de 8 diferentes granjas, las cuales tienen la mayor población caprina del municipio y su principal fin zootécnico es la producción láctea, en forma tecnificada, en estabulación total. Los principales grupos genéticos son Saanen, Alpina francesa y en menor cantidad Toggenburg. Existen antecedentes de enfermedad respiratoria en todas las épocas del año y mastitis

subclínica (diagnóstico realizado por recuento de células somáticas); también se realizaron pruebas de laboratorio para AEC (Artritis y encefalitis caprina), y micoplasmosis, los cuales resultaron negativos (Cuadro 3.2).

Cuadro 3.2 Identificación de los rebaños y el número de muestreos en la zona de Apaseo el grande Gto.

| Rancho | Id | Muestreos Realizados | Promedio de vientres | Antecedentes de Enfermedades | Dx de micoplasmosis | Totalde muestras | % |
|-----------------|------|----------------------|----------------------|------------------------------|--------------------------------------|------------------|------|
| San Pablo | Gto1 | 2 | 150 | ER MS | N E G A T I V O | 110 | 73.3 |
| San Miguel | Gto2 | 2 | 70 | | | 52 | 74.2 |
| Puente Colorado | Gto3 | 2 | 200 | | | 79 | 39.5 |
| Centro Caprino | Gto4 | 1 | 300 | | | 32 | 10.6 |
| Matega | Gto5 | 2 | 240 | | | 119 | 49.5 |
| La Concepción | Gto6 | 1 | 168 | | | 12 | 7.1 |
| Los Piolines | Gto7 | 2 | 140 | | | 76 | 54.2 |
| Chompitas | Gto8 | 2 | 120 | | | 77 | 64.1 |
| Total | | | | | | 557 | |

ER: enfermedad respiratoria; MS: mastitis subclínica; AR: artritis; QC: queratoconjuntivitis; Id: identificación

4.2 Procesamiento de las muestras.

Para el aislamiento de micoplasmas se utilizó el medio de cultivo Hayflick como se indica en el Apéndice 1.

De la muestra del hisopo nasal se tomó 200 μl del medio líquido de transporte Hayflick, y se inoculó en 1.8 ml. a medio líquido fresco de Hayflick. Se realizaron diluciones decimales con medio líquido fresco Hayflick de 10^{-1} a 10^{-3} , incubándolas a 37°C en aerobiosis por un periodo de 48 a 72 hrs hasta 7 días; se tomó 20 μl del hisopo nasal y se sembraron en medio sólido (Apéndice 2), las cuales se incubaron a 37°C en microaerobiosis con un ambiente húmedo durante 48 a 72 hrs hasta 7 días.

La muestra de leche se incubó durante 1 hora a 37°C , para separar la grasa contenida en la muestra y liberar a las bacterias en ellas; se efectuaron diluciones decimales de 10^{-1} a 10^{-3} y se sembraron en medio sólido (Apéndice 2); con la metodología indicada por Tully *et al.*, (1983). Para obtener colonias típicas de micoplasmas este procedimiento se realizó tres veces, aproximadamente durante 30 días. Todas las muestras que presentaban contaminación bacteriana, se procedió a filtrar a $0.45\mu\text{m}$ en líquido fresco e incubar.

Una muestra se consideró positiva al observar colonias típicas de micoplasmas al sembrarlo en medio sólido. Una muestra negativa era aquella que no presentó desarrollo de colonias típicas de micoplasma en medio sólido en un periodo de 30 días.

4.3 Aislamiento del género *Mycoplasma* spp.

Las muestras que desarrollaron colonias típicas de micoplasmas de “huevo frito” en el medio sólido de Hayflick, se purificaron con la técnica de clonación triple la cual consiste en tomar tres colonias perfectamente aisladas, y se depositaron en medio líquido. A las cepas purificadas se les realizaron las pruebas de la digitonina, filtrabilidad a 0.45µm. y reversión de formas L con el objetivo de establecer el género *Mycoplasma* (Tully *et al.*, 1983).

4.4 Identificación Bioquímica.

Las cepas identificadas como *Mycoplasma* spp. fueron tipificadas con las siguientes pruebas bioquímicas siguiendo el protocolo de Whitford H.W., *et al* 1994. Todas las pruebas bioquímicas realizadas, fueron para la identificación de especies aisladas en caprinos y se basan en los cuadros de Whitford H.W. 1994 y Holt JG *et al.*, 1994, (Cuadro 4).

- Fermentación de glucosa,
- Fermentación de manosa,
- Hidrólisis de la arginina,
- Actividad de la fosfatasa,
- Proteolisis de la caseína,
- Reducción de tetrazolio.

Y como prueba complementaria Hemoadsorción.

Cuadro 4. Pruebas bioquímicas de identificación para micoplasmas caprinos.

| Especie | D | G | M | A | C | P | T | H | P/C |
|---|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|------------|
| <i>M. agalactiae</i> | + | - | - | - | N/A | + | +/+ | + | + |
| <i>M. mycoides</i> subsp. <i>capri</i> | + | + | + | - | + | - | +/+ | - | - |
| <i>M. capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i> | + | + | + | D | + | + | +/+ | - | - |
| <i>M. ovipneumoniae</i> | + | + | | - | - | - | W/+ | | - |
| <i>M. putrefaciens</i> | + | + | + | - | N/A | + | W/+ | + | + |

D : Digitonina

G: Glucosa

M: Manosa

A: Arginina

C: Caseína (Rosendal S., 1994 indican que MmLC y Mmc son positivos a caseína) ((*) Razin y Freundt., 1984 indica que Mmc es negativa)

P: Fosfatasa

T: Tetrazolium aerobio/anaerobio

H: Hemadsorción

P/C: Películas y cristales

Reacción: (d) El 11-89% de las cepas son positivas, (W): reacción débil.

N/A: no aplica

4.5 Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó por medio del programa SPSS statics, para aplicar el estudio de Spearman's correlación no paramétrica para observar la correlación entre las diferentes variable identificadas en el estudio. Y por ultimo se aplicó el estudio de chi cuadrada para observar la existencia de diferencias estadísticas entre el primer y segundo muestreo realizados.

5.0 RESULTADOS.

5.1 Identificación de colonias típicas de Mycoplasma.

De las 707 muestras analizadas entre hisopos nasales y leches, se encontró que 29 (4.1%) muestras fueron positivas al crecimiento de colonias típicas de micoplasma (fig.2). De las muestras de leche 23 (3.25%) presentaron crecimiento y de hisopo nasal solo 6 (0.84%) muestras (cuadro 5).



Figura 2. Colonias típicas de micoplasmas observadas en microscopio estereoscópico.

Cuadro 5. Total de muestras positivas al crecimiento de colonias típicas de Mycoplasma.

| Lugar | Núm de muestras | Aislamientos | Leche | Hisopo nasal | % muestras positivas por zona |
|----------------|-----------------|--------------|-------|--------------|-------------------------------|
| Mixteca | 150 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Guanajuato | 557 | 29 | 23 | 6 | 5.20 |
| Total | 707 | 29 | 23 | 6 | 5.20 |
| % total | | 4.1 | 3.25 | 0.84 | |

De las 17 granjas analizadas, el 11.7% (2) de ellas presentaron muestras positivas que corresponden a Apaseo el grande Guanajuato. De la zona de Oaxaca el total de las muestras estudiadas fueron negativas al aislamiento de micoplasmas. Las muestras positivas en

Guanajuato se localizaron en las granjas identificadas como Gto1 y Gto2 con 23 muestras de leche positivas y 6 muestras de hisopo nasal positivas (Cuadro 4.1). La granja Gto1 con 24 (82.7%) muestras positivas y de Gto2 con 5 (17.2%).

5.2 Identificación del género.

Al realizar la purificación de las muestras positivas, se obtuvo 43 colonias las cuales fueron identificadas como *Mycoplasma* spp., los aislados presentaron morfología típica de micoplasma, filtrabilidad por 0.45µm y sensibilidad a la digitonina.

Del total de las muestras positivas, 8 se aislaron de cultivo directo, 18 de un primer pase, y sólo 3 se aislaron de un segundo pase. En el crecimiento relativo, 11 cultivos fueron de crecimiento escaso y 18 cultivos con crecimiento abundante. En el proceso de purificación de los aislados se detectó en 14 (48.2%) de las 29 muestras positivas dos tipos de morfología (Cuadro 5.1). Las colonias mostraron morfología lisa tamaño grande y lisa con tamaño chico (fig.3).

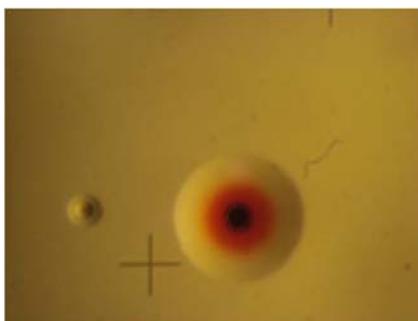


Figura 3. Morfología de colonia lisa tamaño grande y chica.

Cuadro 5.1 Muestras con aislamiento de colonias típicas de *mycoplasma* y las características que presentaron.

| Num. de muestra | ID | Procedencia | Tipo de Muestra | Núm. de muestreo | Obtención del aislamiento | Crecimiento relativo | Número de colonias | Morfología |
|-----------------|------|-------------|-----------------|------------------|---------------------------|----------------------|--------------------|------------|
| 1 | 2M | Gto1 | Leche | 1 | 1er pase | Escaso | 2 | ch/g |
| 2 | 3M | Gto1 | Leche | 1 | Primocultivo | Escaso | 2 | ch/g |
| 3 | 4M | Gto1 | Leche | 1 | Primocultivo | Escaso | 1 | G |
| 4 | 5M | Gto1 | Leche | 1 | 1er pase | Escaso | 1 | G |
| 5 | 6M | Gto1 | Leche | 1 | Primocultivo | Escaso | 1 | G |
| 6 | 7M | Gto1 | Leche | 1 | 1er pase | Abundante | 1 | G |
| 7 | 8M | Gto1 | Leche | 1 | 1er pase | Escaso | 1 | G |
| 8 | 9M* | Gto2 | Leche | 1 | 1er pase | Abundante | 2 | ch/g |
| 9 | 10M= | Gto1 | Hisopo | 1 | Primocultivo | Escaso | 2 | ch/g |
| 10 | 11M= | Gto1 | Hisopo | 1 | 2do pase | Abundante | 1 | G |
| 11 | 12M* | Gto2 | Hisopo | 1 | 2do pase | Abundante | 2 | ch/g |
| 12 | 13M | Gto1 | Leche | 2 | 1er pase | Abundante | 2 | ch/g |
| 13 | 14M | Gto1 | Leche | 2 | 1er pase | Escaso | 2 | ch/g |
| 14 | 15M | Gto1 | Leche | 2 | 1er pase | Abundante | 1 | G |
| 15 | 16M= | Gto1 | Leche | 2 | 1er pase | Abundante | 1 | G |
| 16 | 17M | Gto1 | Leche | 2 | Primocultivo | Abundante | 2 | ch/g |
| 17 | 18M= | Gto1 | Leche | 2 | 1er pase | Abundante | 2 | ch/g |
| 18 | 19M= | Gto1 | Leche | 2 | 1er pase | Abundante | 2 | ch/g |
| 19 | 20M | Gto1 | Leche | 2 | Primocultivo | Abundante | 1 | G |
| 20 | 21M | Gto1 | Leche | 2 | 1er pase | Abundante | 1 | G |
| 21 | 22M | Gto1 | Leche | 2 | 1er pase | Abundante | 2 | ch/g |
| 22 | 23M | Gto1 | Leche | 2 | 1er pase | Abundante | 2 | ch/g |
| 23 | 24M | Gto1 | Leche | 2 | 1er pase | Abundante | 2 | ch/g |
| 24 | 25M | Gto2 | Leche | 2 | 1er pase | Abundante | 2 | ch/g |
| 25 | 26M | Gto2 | Leche | 2 | 1er pase | Escaso | 1 | G |
| 26 | 27M | Gto2 | Leche | 2 | 1er pase | Escaso | 1 | G |
| 27 | 28M= | Gto1 | Hisopo | 2 | Primocultivo | Abundante | 1 | G |
| 28 | 29M | Gto1 | Hisopo | 2 | 2do pase | Abundante | 1 | G |
| 29 | 30M | Gto1 | Hisopo | 2 | Primocultivo | Escaso | 1 | G |

ID: Identificación; * Muestras procedentes de la misma cabra; = Cabras enfermas; Crecimiento relativo: escaso (menor a 10 colonias); abundante (mayor a 50 colonias); ch: colonia chica ; g: colonia grande

5.3 Identificación bioquímica.

La identificación bioquímica se realizó por medio de las pruebas ya especificadas en el cuadro 2.3; siguiendo el protocolo de Whitford H.W., *et al.*, (1994); para la identificación de las especies que afectan a los pequeños rumiantes (Cuadro 5.2).

Cuadro 5.2. Resultados de la identificación bioquímica de las colonias purificadas

| Muestra | Id | Tipo | Colonia | F | D | G | M | A | C | H | Fo | T | Id final |
|---------|------|--------|---------|---|---|---|---|---|---|---|----|-----|-----------------|
| 1 | 2 M | Leche | Grande | + | S | + | + | - | + | - | - | NA | M.mc |
| 2 | 2M | Leche | Chica | + | S | + | + | - | + | - | - | NA | M.mc |
| 3 | 3 M | Leche | Grande | + | S | + | + | - | + | - | - | NA | M.mc |
| 4 | 3 M | Leche | Chica | + | S | + | + | - | + | - | - | NA | M.mc |
| 5 | 4M | Leche | Grande | + | S | + | + | - | + | - | - | NA | M.mc |
| 6 | 5M | Leche | Grande | + | S | + | + | - | + | - | - | NA | M.mc |
| 7 | 6M | Leche | Grande | + | S | + | + | - | + | - | - | NA | M.mc |
| 8 | 7M | Leche | Grande | + | S | + | + | - | + | - | + | +/+ | M. cc |
| 9 | 8M | Leche | Grande | + | S | + | + | - | + | - | + | +/+ | M. cc |
| 10 | 9 M | Leche | Grande | + | S | + | + | - | + | - | + | +/+ | M. cc |
| 11 | 9 M | Leche | Chica | + | S | + | + | - | + | - | - | NA | M.mc |
| 12 | 10M | Hisopo | Grande | + | S | + | + | - | + | - | - | NA | M.mc |
| 13 | 10 M | Hisopo | Chica | + | S | + | + | - | + | - | - | NA | M.mc |
| 14 | 11M | Hisopo | Grande | + | S | + | + | - | + | - | - | NA | M.mc |
| 15 | 12 M | Hisopo | Grande | + | S | + | + | - | + | - | - | NA | M.mc |
| 16 | 12M | Hisopo | Chica | + | S | + | + | - | + | - | - | +/- | M. conjuntivae. |
| 17 | 13M | Leche | Grande | + | S | + | + | - | + | - | + | +/+ | M. cc |
| 18 | 13M | Leche | Chica | + | S | + | + | - | + | - | + | +/+ | M. cc |
| 19 | 14M | Leche | Grande | + | S | + | + | - | + | - | - | NA | M.mc |
| 20 | 14M | Leche | Chica | + | S | + | + | - | + | - | - | NA | M.mc |
| 21 | 15M | Leche | Grande | + | S | + | + | - | + | - | - | NA | M.mc |
| 22 | 16M | Leche | Grande | + | S | + | + | - | + | - | + | +/- | M. conjuntivae. |
| 23 | 17M | Leche | Grande | + | S | + | + | - | + | - | + | +/+ | M. cc |
| 24 | 17M | Leche | Chica | + | S | + | + | - | + | - | - | NA | M.mc |
| 25 | 18M | Leche | Grande | + | S | + | + | - | + | - | - | NA | M.mc |
| 26 | 18M | Leche | Chica | + | S | + | + | - | + | - | - | NA | M.mc |
| 27 | 19M | Leche | Grande | + | S | + | + | - | + | - | - | NA | M.mc |
| 28 | 19M | Leche | Chica | + | S | + | + | - | + | - | - | NA | M.mc |
| 29 | 20M | Leche | Grande | + | S | + | + | - | + | - | - | NA | M.mc |
| 30 | 21M | Leche | Grande | + | S | + | + | - | + | - | - | NA | M.mc |
| 31 | 22M | Leche | Grande | + | S | + | + | - | + | - | - | NA | M.mc |
| 32 | 22M | Leche | Chica | + | S | + | + | - | + | - | - | NA | M.mc |
| 33 | 23M | Leche | Grande | + | S | + | + | - | + | - | - | NA | M.mc |
| 34 | 23M | Leche | Chica | + | S | + | + | - | + | - | - | NA | M.mc |
| 35 | 24M | Leche | Grande | + | S | + | + | - | + | - | + | +/+ | M. cc |
| 36 | 24M | Leche | Chica | + | S | + | + | - | + | - | - | NA | M.mc |
| 37 | 25M | Leche | Grande | + | S | + | + | - | + | - | - | NA | M.mc |
| 38 | 25M | Leche | Chica | + | S | + | + | - | + | - | - | NA | M.mc |
| 39 | 26M | Leche | Grande | + | S | + | + | - | + | - | - | NA | M.mc |
| 40 | 27M | Leche | Grande | + | S | + | + | - | + | - | - | NA | M.mc |
| 41 | 28M | Hisopo | Grande | + | S | + | + | - | + | - | - | NA | M.mc |
| 42 | 29M | Hisopo | Grande | + | S | + | + | - | + | - | - | NA | M.mc |
| 43 | 30M | Hisopo | Grande | + | S | + | + | - | + | - | - | NA | M.mc |

Id: identificación; M.mmLC: *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC; M. capricolum: Hisopo: hisopo nasal; NA: No aplica *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* ; +: Positiva; -: Negativa; s: Sensible; T: tetrazolio aerobio/anaerobio
F: filtrable; D: digitonina; G: glucosa; M: manosa; A: arginina; C: caseína; H: hemoadsorción; Fo: fosfatasa; T: tetrazolium

Las 43 cepas de *Mycoplasma* spp., 34 (79 %) fueron identificadas como *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC), reaccionaron positivamente a Glucosa, Manosa, Digestión de la Caseína, y Tetrazolio, y reaccionaron negativamente a Fosfatasa, y Arginina. Tan solo 7 (16.2%) cepas se diagnosticaron como *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*; ya que fueron: positivos a Glucosa, Manosa, Digestión de la Caseína, Fosfatasa, Tetrazolio, y fueron negativos a Arginina. 2 (4.6%) cepas fueron identificadas como *Mycoplasma conjunctivae*.

5.4 Granjas positivas al aislamiento de micoplasmas.

En solo dos granjas de la región de Apaseo el grande se encontraron aislamientos de micoplasmas tanto de muestras de leche e hisopo nasal. Las granjas fueron identificadas como la Granja San Pablo (Gto1) y Granja San Miguel (Gto2), (Cuadro 5.3).

5.4.1 Granja San Pablo (Gto1)

De la granja Gto1 se tenía antecedentes de problemas respiratorios, los animales presentaron escurrimiento nasal y dificultad para respirar (fig. 4). De esta granja se pudieron aislar micoplasmas, tanto de hisopo nasal y leche. Se identificaron a 6 animales que presentaban una signología aparente de enfermedad respiratoria, las muestras tomadas de ellas fueron positivas al crecimiento de colonias, 3 fueron de hisopo y 3 de leche; solo 2 fueron positivas en el primer muestreo y 4 en el segundo muestreo, todas éstas de diferentes cabras pertenecientes a Gto1. En la identificación bioquímica 5 de las 6 muestras fueron identificadas como MmmLC y solo 1 fue identificada como *Mycoplasma conjunctivae* (Cuadro 5.3).



Figura 4. Cabra con signos aparentes de enfermedad respiratoria.

Cuadro 5.3. Resultados en la identificación bioquímica de las muestras positivas en la granja San pablo.

| Muestra | <i>Mmc</i> | <i>Mcc</i> | <i>M. conjunctivae</i> | Total |
|--------------|------------|------------|------------------------|-----------|
| Leche | 22 | 6 | 1 | 29 |
| Hisopo | 6 | | | 6 |
| Total | 28 | 6 | 1 | 35 |

5.4.2 Granja San Miguel (Gto2)

Dentro de los dos muestreos se totalizaron 52 muestras de las cuales, 5 fueron positivas a micoplasmas, 1 obtenida de hisopo nasal y 4 de leche directa todas ellas identificadas como *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* y solo una identificada como *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* (Cuadro 5.4). Las muestras identificadas con el número 9M y 12M procedentes de Gto2 fueron obtenidas de la misma cabra, de ésta se aislaron colonias tanto de de la muestra de hisopo como de leche en el primer muestreo.

Cuadro 5.4 Resultados en la identificación bioquímica de las muestras positivas en la granja San Miguel.

| Muestra | Mmc | Mcc | M. conjunctivae | Total |
|--------------|----------|----------|--------------------|----------|
| Leche | 5 | 1 | | 6 |
| Hisopo | 1 | | 1 | 2 |
| Total | 6 | 1 | 1 | 8 |

Cuadro 5.5 Porcentaje de aislamientos de granjas positivas en Guanajuato.

| Granja | Total de muestras | % positivas | Tipo de granja |
|-------------------|-------------------|-------------|----------------|
| San Pablo (Gto1) | 110 | 31.8 | Tecnificada |
| San Miguel (Gto2) | 52 | 15.3 | Tecnificada |

5.4.3 Análisis estadístico.

En el estudio de correlación no paramétrica de Spearman's, se observó la correlación entre la morfología colonial y la especie *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* como se presenta en el cuadro 5.4, con una $P < 0.01$, se encontró que existe una alta correlación de 0.69 entre las colonias grandes y la especie *Mmc*.

**Cuadro 5.4 Correlación no paramétrica de Spearman's
Correlación**

| | | mor | idMmc |
|---------------------------|----------------------------|------------|--------------|
| Spearman's rho mor | Coeficiente de correlación | 1,000 | ,694** |
| | Sig. (2-colas) | . | ,000 |
| | N | 29 | 29 |
| idMmc | Coeficiente de correlación | ,694** | 1,000 |
| | Sig. (2-colas) | ,000 | . |
| | N | 29 | 29 |

** . La correlación es significativa al nivel 0.01 (2-colas).

Mor: morfología

idMmc: identificación de *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*

En el estudio de chi cuadrada con una $P > 0.05$ no existió diferencia estadística con una $P=0.534$ entre las siguientes variables: Animales enfermos, animales sanos, Primer muestreo, segundo muestreo, morfología colonial y especie identificada.

6.0 DISCUSIÓN

6.1 Muestras con crecimiento positivo.

El aislamiento de micoplasmas en casos de enfermedad a partir de muestras de leche, tejido pulmonar, hisopos de oído externo, fluido articular e hisopos nasales de caprinos, es fundamental para la identificación del género y especie involucrada, utilizando para ello reacciones metabólicas, técnicas moleculares como la PCR y la identificación serológica (Thiaucort, F. *et al.*, 2000).

Del total de las muestras analizadas (707), 29 (4.1%) fueron positivas a *Mycoplasma* spp. De las 305 muestras de leche 23 (7.54%) fueron positivas, y de las 402 muestras de hisopo nasal, 6 (1.49%) mostraron positividad. Al compararlo con un estudio similar presentado por Al-Momami W. *et al.*, (2006) en Jordania realizado en cabras analizaron 372 muestras directas de leche e hisopos nasales, en hatos con problemas de artritis, mastitis y neumonía, signos clínicos sugerentes de ACC y de PCC; lograron obtener 29 (7.79%) muestras positivas, e identificarlas como *Mycoplasma* spp. Asimismo, este autor obtuvo de las 62 muestras de leche analizadas, 17 (27.41%) positivas, y de las 310 muestras de hisopo, 12 (3.87%). Aunque en este trabajo se presenta un mayor porcentaje de aislamientos, cabe destacar que son de hatos con problemas de ACC y PCC; por lo tanto se puede suponer que en un grupo de granjas sin aparentes signos clínicos relacionados con las dos enfermedades ya mencionadas el porcentaje de aislamientos debe ser menor o nulo, por último destacando que Jordania es un país endémico de ACC y PCC y en México no se han reportado casos de

éstas enfermedades. Sin embargo se puede destacar que el tipo de muestras utilizadas por Al-Momami W., es similar a nuestro estudio, por lo que se puede suponer que el aislamiento y la identificación de los micoplasmas a través de este tipo de muestras son factibles.

En el manejo de muestras de hisopos nasales para el aislamiento de micoplasmas, autores como Sheehan M., *et al.*, (2005) comentan que la utilización de este recurso puede ser viable pero la cantidad de flora bacteriana complica el aislamiento del agente, demostrándolo en su trabajo, al tomar muestras de hisopo nasal en borregos sanos y enfermos lograron aislar e identificar a *Mycoplasma ovipneumoniae* (26%). Como se puede manifestar en nuestro trabajo el porcentaje de muestras de hisopos nasales positivas fue bajo (1.49%), esto se puede atribuir a lo ya manifestado por Sheehan M., a la complicación que ocasiona la microbiota bacteriana. Otro punto a enfatizar es que de 6 muestras de hisopo nasal en las que se encontraron colonias con morfología típicas de micoplasma, 3 fueron obtenidas de animales aparentemente enfermos y las otras 3 de animales aparentemente sanos, corroborando que es posible aislar micoplasmas patógenos tanto de animales sanos y enfermos.

6.2 Morfología de las colonias

Con respecto a la morfología colonial, de las 29 muestras se observó que las colonias eran lisas y de tamaño grande, esta morfología es característica de la especie *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (MmmLC) ; Egwu GO. *et al.*, (2000) destacan el gran tamaño de las colonias en comparación del tamaño de SC (small colony), los autores consideraron estas

características como una forma de identificación para esta especie de micoplasma. Estudios realizados por Valdivieso-García y Rosendal S., (1982) reportan que es irrelevante identificar a una colonia por su tamaño como LC o SC, consideraron que la morfología colonial: lisa y con punto central grande es típico de la especie de *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* anteriormente llamada *Mycoplasmas mycoides* subsp. *mycoides* LC. Los resultados del presente trabajo coinciden con las observaciones de Valdivieso-García y Rosendal S., (1982), 14 muestras presentaron diferente tamaño de colonias (chica y grande), caracterizándose por ser lisas y tener un punto central grande. Todas ellas fueron identificadas como *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*, lo que supone que la relación entre el tamaño de la colonia y la subespecie LC o capri no son un punto de referencia para su identificación final. Pero al realizar una correlación no paramétrica de Spearman's entre la morfología y la identificación de *Mycoplasma mycoides* subsp *capri* se encontró que con una $P < 0.01$ y con una correlación de 0.69 es significativa la relación entre la morfología grande y la identificación de *Mycoplasma mycoides* subsp *capri*, por lo que se le puede atribuir esta distinción entre otros micoplasmas como lo menciona Egwu G.O., *et al*, (2000), no obstante la correlación no es muy alta, por lo tanto no se puede descartar que se pueden encontrar otro tipo de morfologías para esta especie como las encontradas en este estudio. Autores como Whitford H.W., *et al* 1994 atribuye factores como las condiciones de incubación, el medio utilizado y el tiempo de incubación para el desarrollo de una morfología definida, ya que han observado que el crecimiento de micoplasmas en un periodo de 48 a 72 horas, las colonias se presentan como pequeños puntos en comparación de cultivos de más de 72 horas que su morfología es más definida y relacionando también a la adaptación de los micoplasmas al medio conforme se realizan los diferentes pases. Por lo que suponemos que las diferentes morfologías encontradas en las muestras de este estudio

se relacionan a estos factores ya mencionados, ya que de las 29 muestras positivas se encontró crecimiento bacteriano en cultivo puro y en los segundos pases.

6.3 Identificación Bioquímica.

Con respecto a la identificación bioquímica, de las 43 colonias purificadas. En la identificación bioquímica 34 (79.1%) fueron tipificadas como *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*; siendo 28 (65.1%) de leche directa y sólo 6 (13.9%) de hisopo nasal; 7 (16.2%) colonias se identificaron como *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*. Los 2 (4.6%) aislados identificados como *Mycoplasma conjunctivae* provienen de hisopo nasal y de leche directa.

Al comparar nuestros resultados con los obtenidos en trabajos que se realizaron con el mismo tipo de muestras como el de Al-Momami W. *et al.*, (2006), en el cual realizaron estudios en cabras con problemas de artritis, mastitis y neumonía, signos clínicos sugerentes de ACC y de PCC, en 62 muestras de leche directa y 310 de hisopos nasales; lograron aislar e identificar 17 (26%) de las 62 muestras de leche; 8 (47.1%) fueron **Mp**, 3 (17.6%), **Mmc** (*MmmLC*), 5 (29.4%) como **Mcc** y 1 como **Ma** (5.8%). Al analizar las 310 muestras de hisopo nasal pudieron aislar e identificar 12 (3.9%) colonias, de las que 5 (41.6%) se identificaron como **Mp**, 1 (8.3%) **Mmc** (*MmmLC*) y 6 (50%) como **Mcc**. De la Fe C. *et al.*, (2007) en diferentes zonas de Lanzarote, España en animales aparentemente sanos, obtuvieron 31 muestra de leche directa y aislaron 9 (29%) con crecimiento de colonias típicas de micoplasmas, de las cuales, 7 (77.7%) se identificaron como *Mycoplasma capricolum* subsp *capricolum* y 2 (22.2%) a *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC. En otro estudio realizado en Pakistán, por Awan M.A. *et al.*, (2009);

tomaron 30 muestras de hisopo nasal y pulmón en cabras con enfermedad respiratoria, aislando de 14 (46.6%) muestras; y en 12 (40%) de ellas a *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* y en 2 (6.7%) a *Mycoplasma putrefaciens*. De todos estos estudios (Cuadro 6), se debe destacar que son de zonas endémicas a enfermedades como la ACC y la PCC, por lo tanto el porcentaje debe ser mayor en comparación al de este trabajo, incluyendo el trabajo realizado por De la Fe C. *et al.*, (2007) en animales aparentemente sanos. Es importante señalar que en este estudio la mayoría de los animales se encontraban clínicamente sanos aun así se identificó a especies como **Mcc** y **Mmc**. México al ser un país libre de la ACC y la PCC debe de estar libre de los micoplasmas causantes de estas enfermedades, como se pudo observar en las muestras positivas de nuestro trabajo, aun siendo de animales sanos y con aparente enfermedad respiratoria y de mastitis, por lo que podemos suponer que en los casos de cabras enfermas los principales agentes patógenos son **Mmc**. Un caso en particular es el de la cabra proveniente de la granja Gto2 aparentemente sana, la cual fue positiva tanto en la muestra de leche como en la de hisopo nasal, aislándose 2 colonias, de la muestra de leche identificada como *M. mycoides* subsp. *capri* y *M. capricolum* subsp. *capricolum*; y en la muestra de hisopo nasal se identificó a *M. mycoides* subsp. *capri* y *Mycoplasma conjunctivae*, especies que se involucran en problemas respiratorios y mastitis; situación similar al estudio De la Fe *et al.*, (2007), por lo que el aislamiento de estos agentes patógenos se pueden encontrar en cabras aparentemente sanas o portadoras asintomáticas.

Cuadro 6.0 Porcentaje comparativo de aislamientos de micoplasmas en cabras.

| Autor | Tipo de muestras | No. De muestras | Especies aisladas | % de muestras positivas | % de las especie Mmc y Mcc |
|--|-------------------------|------------------------|--|--------------------------------|--|
| Al-Momani W. <i>et al.</i> , (2006) Jordania | Leche | 62 | <i>Mp</i> y <i>MmmLC</i> , <i>Mcc</i> y <i>Ma</i> | 26% | <i>Mmc</i> (17.6%) <i>Mcc</i> 29.4% |
| Al-Momani W. <i>et al.</i> , (2006) Jordania | Hisopo nasal | 310 | <i>Mp</i> , <i>MmmLC</i> y <i>Mcc</i> | 3.9% | <i>Mmc</i> 8.3% <i>Mcc</i> 50% |
| De la Fe <i>et al.</i> , (2007) España | Leche directa | 31 | <i>Mcc</i> y <i>MmmLC</i> | 29% | <i>Mmc</i> 22.2% <i>Mcc</i> 77.7% |
| Awan M.A. <i>et al.</i> , (2009) Pakistan | Hisopo Nasal | 30 | <i>Mp</i> , <i>Mcc</i> | 46.6% | <i>Mcc</i> 40% |
| Jiménez A. (2011) | Leche, | 305 | <i>Mmc</i> , (<i>MmmLC</i>) , <i>Myc spp.</i> , <i>Mcc</i> | 7.5% | <i>Mmc</i> 65.1% <i>Mcc</i> 2.4% |
| Jiménez A. (2011) | Hisopo Nasal | 402 | <i>Mmc</i> , (<i>MmmLC</i>), <i>Myc spp</i> | 1.4% | <i>Mmc</i> 13.9% <i>Mcc</i> 2.3% |

MmmLC: *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC
Mcc: *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*
Mycspp: *mycoplasma* spp
Mmc: *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*
Ls: líquido sinovial
So: secreción ocular

Mycoplasma mycoides subsp. *capri*, aislado en este trabajo, causante de mastitis y enfermedad respiratoria, que tiene un alto impacto en las cabras domésticas o silvestres; se han encontrado casos de micoplasmosis en la cabra salvaje *Capra pirenaica* describiéndola como una enfermedad de curso devastador en hembras y animales jóvenes Verbisck-Bucker G *et al.*, (2008).

Una de las dos especies identificadas en este trabajo, es *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*, todas de muestras de leche. Agente que ocasiona mastitis, artritis y neumonías, causante de una pleuroneumonía fibrinosa, como lo describe el trabajo de Guiadini N.D. *et al.*, (2008), donde 400 cabras presentaron signos respiratorio y de locomoción, aislaron e identificaron a *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*. Esto nos puede indicar que por sí solo el agente puede afectar a las cabras de forma severa. Por su parte *Mycoplasma conjunctivae* se caracteriza por causar inflamación en la conjuntiva y la cornea, comúnmente afectando a pequeños rumiantes, el cual ha sido aislado de hisopos de la conjuntiva pero también de muestras nasofaríngeas (Belloy L. *et al.*, 2003).

6.4 Estudio comparativo de las dos granjas positivas al aislamiento de Mycoplasma.

Las dos únicas granjas en las que se obtuvieron aislamientos de diferentes especies; Gto1 (San pablo) y Gto2 (San Miguel), están localizadas en la misma región. Las características generales entre estas zonas son diferentes, desde el tipo de producción, el manejo, las razas y el clima, factores suficientes que podrían definir el comportamiento de una enfermedad.

6.4.1 Granja San Pablo (Gto1).

De los dos muestreos realizados, en el primero se encontraron cabras con signos clínicos de enfermedad respiratoria que aparentemente recibían tratamiento con oxitetraciclinas, sin embargo se hallaron muestras positivas, ya que estudios realizados por El Hasam S., *et al.*, (1984) inocularon experimentalmente a cabras con el microorganismo causal de la pleuroneumonía contagiosa caprina y fueron tratados a los pocos días con oxitetraciclina y

tilosina., sin embargo, el 20% de los casos tratados permanecieron como portadores de la enfermedad y fueron capaces de transmitir la infección. Indicando que la eliminación completa de los micoplasmas rara vez se logra y los animales tratados siempre deben ser considerados como portadores potenciales de la enfermedad. Esto se puede constatar al obtener del primer muestreo, 9 casos positivos de los cuales 2 provienen de cabras enfermas; en el segundo muestreo 15 casos fueron positivos, 4 provienen de cabras enfermas con signos clínicos respiratorios y 11 de cabras aparentemente sanas. Por lo tanto el aumento considerable de muestras positivas en el segundo muestreo coincide con la aseveración hecha por El Hasam S., *et al.*, (1984) y en este trabajo, aquellos animales que recibieron tratamiento en el primer muestreo pudieron funcionar como portadores de la micoplasmosis.

6.4.2 Granja San Miguel (Gto2) Guanajuato.

En los dos muestreos se obtuvieron un total de 52 muestras de las cuales 5 fueron positivas a micoplasmas, 1 obtenida de hisopo nasal y 4 de leche directa, todas ellas identificadas como *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* y solo una identificada como *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*; especies involucradas en problemas de mastitis y enfermedad respiratoria. Se puede mencionar que entre granjas llegaban a prestar a sus sementales o a intercambiar animales, como también adquirían pie de cría del mismo lugar, esto podría dar lugar a transmitir la enfermedad de granja a granja. Como lo indica Nicholas R.A.J, (2002) una buena forma de controlar la infección es evitar el movimiento de animales y sacrificar a aquellos que estén infectados.

Dentro de la ecología del desarrollo de una enfermedad (hospedador, mediador ambiental, agente patógeno) en el caso de la infección intramamaria el manejo del ordeño y las características del animal son los factores más importantes que favorecen a la enfermedad. Como lo comentan Sánchez *et al.*, (1997), la producción aunque sea de un nivel tecnificado, no indica un estatus sanitario excelente, al contrario, para obtener ese estatus se necesitan practicas de manejo precisas para evitar cualquier enfermedad. Los factores que se mencionan y que son puntos críticos en el manejo de la cabra lechera son las características de la máquina del ordeño, ya que si no se maneja adecuadamente esta puede ser contraproducente en la producción; la higiene en el ordeño es otro factor que puede bajar la prevalencia en más del 8.7% en enfermedades transmitidas por otras cabras según Contreras A., *et al.*, (2003). Por lo que es determinante para prevenir algún tipo de enfermedad en granjas tecnificadas, son las prácticas de manejo que se dan en la producción; al comparar y destacar las prácticas de manejo de estas dos zonas, se puede observar que son extremadamente diferentes y por lo tanto los factores ya mencionados podrían ser causa del porcentaje de aislamientos en estas dos zonas.

6.5 Casos de animales con aparente enfermedad respiratoria y mastitis.

De las 29 muestras positivas, solo una cabra presentaba una avanzada enfermedad respiratoria y mastitis, como son estertores, dificultad para respirar, secreción nasal y una condición corporal de 2, misma que en la muestra de hisopo nasal se pudo aislar dos colonias de diferente tamaño que fueron identificadas como *M. mycoides* subsp *capri*. Las cinco cabras que compartían corral con la enferma todas presentaban mastitis subclínica y secreción nasal, de ellas se obtuvieron colonias identificadas como *M. mycoides* subsp

capri y una identificada como *Mycoplasma conjunctivae.*, tres de ellas provienen de leche y 2 muestras de hisopo nasal, al realizar el segundo muestreo las cabras positivas ya no fueron localizadas, por lo tanto no se pudo dar seguimiento de los casos (Cuadro 6.1). En estos casos en particular, la transmisión de la enfermedad se le puede atribuir al hecho de compartir corral y por lo tanto estar en contacto directo con la cabra enferma y los fluidos que el animal pudo desechar, como son expectoraciones, fluido nasal y leche, además del compartir comedero, como lo menciona Egwu GO., *et al*, 2000, que la primer forma de transmisión es el contacto directo con un animal infectado. En el tema referente a los micoplasmas que se pudo identificar como *M. conjunctivae* proveniente de leche, De la Fe *et al.*, (2008) estudiaron el posible efecto del *Mycoplasma* spp. en la calidad de la leche, llegando a la conclusión que su alteración es mínima en el porcentaje de proteína y grasa; por lo que cabe señalar que no se debe descartar la posibilidad de otro tipo de afecciones en la que participen otros micoplasmas, así que sería importante llegar a su identificación final.

Cuadro 6.1 Identificación de las especies en caprinos con problemas respiratorios

| ID de animales enfermos | No de colonias | Tipo de muestra | Especies identificación | Granja |
|-------------------------|----------------|-----------------|-------------------------|--------|
| 10* | 2 | Hisopo nasal | <i>Mmc</i> , | Gto1 |
| 11 | 1 | Hisopo nasal | <i>Mmc</i> | Gto1 |
| 16 | 1 | Leche | <i>M. conjunctivae</i> | Gto1 |
| 18 | 2 | Leche | <i>Mmc</i> | Gto1 |
| 19 | 2 | Leche | <i>Mmc</i> | Gto1 |
| 28 | 1 | Hisopo nasal | <i>Mmc</i> | Gto1 |

MmmLC: *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*
 *: Cabra con avanzada enfermedad respiratoria
 ID: identificación
 Gto1: Granja San Pablo

Como se muestra en el cuadro 6.1, *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* podría estar involucrada tanto en problemas respiratorios y de mastitis, ya que pudo aislarse en los dos tipos de muestras en las cabras con enfermedad respiratoria y la eliminación del microorganismo no solo se puede dar en secreciones nasales sino también en leche aunque no padezcan de mastitis, por lo tanto se puede suponer que la micoplasmosis causada por esta especie llega a ser sistémica.

Todas aquellas muestras provenientes de cabras que aparentemente no presentaban signos clínicos y que se aislaron colonias típicas de micoplasmas, de las 34 colonias aisladas se identificaron en un 79.1% a *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*, en un 16.2% a *Mycoplasma capricolum* y en un 4.6% a *Mycoplasma conjunctivae*. En el estudio realizado por Tardy F. *et al.*, (2007), aislaron a *MmmLC* en diferentes granjas de Francia con antecedentes de micoplasmosis en cabras asintomáticas para observar la prevalencia de *M. mycoides*, Tardy *et al.*, (2007), justifica que algunas de las causas de la conducta patógena de los micoplasmas aislados de animales sanos, es el mecanismo genético que poseen que les da la capacidad de escapar de la respuesta inmune del hospedador y también como un factor determinante el manejo de las cabras de aptitud láctea. Algunos autores han expuesto que se pueden encontrar animales asintomático de los cuales se han aislado micoplasmas altamente patógenos como es el caso de Damaza A.J. *et al.*, 1991 que a partir de muestras de conducto auditivo externo aislaron a *Mycoplasma mycoides* subsp *mycoides* LC y otras especies en animales aparentemente sanos exponiendo que el oído externo puede ser un reservorio de micoplasmas y atribuyendo que una de las principales vías de infección entre animales es por medio de vectores como son los ácaros portadores de micoplasmas, aun así el encontrar a animales sanos portadores de micoplasmas patógenos requiere de mayor

estudio Otros factores como lo describen Pitcher *et al.*, (2005), para que un micoplasma pueda causar un cuadro de enfermedad, se determina por la forma en cómo adquirió dicha bacteria, desde el propio contacto que se puede dar entre un animal sano y un animal portador del microorganismo, como también la vía de entrada de los micoplasmas que puede definir el comportamiento patógeno de este. No hay estudios específicos sobre el estrés en cabras y sus probables consecuencias en adquirir la micoplasmosis, pero en el caso de la enfermedad conocida como “fiebre de embarque”, causante de neumonía en rumiantes, el estrés es un factor determinante en la patogenia de esta enfermedad y factores como los cambios de temperatura, hacinamiento prolongado, mala nutrición y una producción intensiva, ayudan a que bacterias saprófitas oportunistas causen algún tipo de enfermedad en el ganado, como es el caso de varias especies de micoplasmas con la interacción de otros agentes (Robert A. Smith DVM 2004). Al observar los casos presentados en este estudio, el porcentaje mayor de aislamientos se realizó en las granjas ubicadas en Apaseo el grande Gto. de cabras aparentemente sanas, en donde se practica una producción tecnificada o intensiva que conlleva a un manejo mayor de los animales y los factores ya expuestos; como también el intercambio de animales entre granjas y posiblemente el tratamiento poco efectivo a los animales enfermos pudieron acarrear el porcentaje mayor de muestras positivas. A diferencia de de las granjas de Oaxaca, que con un sistema semi-intensivo el manejo de los animales es menor y por lo tanto los factores ya mencionados afectan menos a los animales, esto nos hace suponer el no encontrar muestras positivas en esta zona, sin dejar a un lado otros puntos a considerar como la sensibilidad de los micoplasmas al medio ambiente y el cuidado que se debe proporcionar al transporte de las muestras obtenidas.

Por estos motivos es de suma importancia establecer técnicas de diagnóstico efectivas para el aislamiento y la identificación de los micoplasmas causantes de enfermedad y así poder monitorear el comportamiento de este microorganismo, ya que como se pudo observar en este trabajo, no existen estudios recientes sobre la micoplasmosis en México, sobre todo de carácter epidemiológico que nos darían herramientas suficientes para establecer un monitoreo en los estados con mayor afección por este microorganismo en el país.



Figura 5. Cabras productoras de leche.

7.0 CONCLUSIONES

1. De la población caprina en estudio se logró el aislamiento 4.1 % de muestras positivas 29/ 707, resultado por debajo al estimado en la hipótesis. Este porcentaje muestra que los caprinos de la zona de Guanajuato han tenido contacto con *Mycoplasma* spp, en contraste con la zona de Oaxaca que fue negativa al aislamiento de micoplasmas.
2. Se estableció con la identificación bioquímica al género *Mycoplasma* y las especies del grupo *mycoides* como se determinó en la hipótesis, las especies identificadas fueron *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* y *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* causantes de enfermedad en las cabras.
3. Al encontrar un mayor porcentaje de muestras positivas en leche (7.5%), a las obtenidas en hisopo nasal (1.4%), esto se puede atribuir a la presencia de mastitis subclínica en las granjas estudiadas.
4. De las 29 muestras positivas el 79.3% pertenecen a cabras sanas donde se identificó a *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* y a *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* por lo que se deduce que existe la posibilidad de encontrar animales portadores asintomáticos o animales que no cedieron al tratamiento. El 20.6% de las muestras, pertenecen a cabras enfermas con problemas respiratorios, aislándose solamente a *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*, posiblemente el agente causal de la enfermedad ya que no se aisló a otra especie de micoplasma.

8.0 REFERENCIAS

1. Proyecto Integral de Desarrollo y Capacitación Tecnológica para la Caprinocultura en el Estado de Puebla 2007. Gobierno de los Estados Unidos Mexicanos A traves del gobierno del estado de Puebla y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), para la ejecución del proyecto UTF/MEX/069/MEX.
2. OIEDRUS., Oficina Estatal de Información para el Desarrollo Rural Sustentable. Sistemas de producción. [serial online] 2010 Available from: [URL:http://www.oedrus-nl.gob.mx/oedrus/](http://www.oedrus-nl.gob.mx/oedrus/).
3. SAGARPA; Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) [serial online] 2010 agosto [cited 2010 sep]. Available from: URL: <http://www.siap.gob.mx/>.
4. Gaitán GJ, Programa Estratégico de investigación y transferencia de tecnología. Cadena Agroalimentaria de Caprinos. Centro de Agronegocios, Tecnológico de Monterrey. 2003:1-15.
5. World Organisation for Animal Health., Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 5ht edition, Contagious Agalactia. OIE, 2004.
6. Egwu, GO, Ball HJ, Rodríguez F., Fernández A. *Mycoplama capricolum* subspecies *capricolum*, *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* LC and *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri* in “Agalactia Síndrome” of sheep and goats. Vet Bull 2000;70:391-401.

7. Razin S, Yogev D, Naot Y, Molecular biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62:1094-1148.
8. Miranda M.R.E., Detección de Micoplasmas en Muestras de Leche de Tanque en Explotaciones Caprinas y su Realación con el Recuento celular. (Tesis Doctoral) España: Universidad de Murcia 2003.
9. Nicholas R.A.J., Improvements in the diagnosis and control of diseases of small ruminants caused by micoplasmas. *Small Ruminant Research* 2002; 45:145-149.
10. World Organisation for Animal Health., Lista de Enfermedades de Declaración Obligatoria. OIE. 2006.
11. SAGARPA. Lista de las enfermedades y plagas de los animales exóticos y endemicos de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos. *Diario Oficial.*, 2007.
12. Hailu Kinde, Al J. DaMassa, Patricia S. Wakenell, R. Petty., Mycoplasmas infection in a comercial goat dairy caused by *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (caprine biotype). *J. Vet. Diagn. Invest.* 1994. 6:423-427.
13. World Organisation for Animal Health, Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals Contagious Caprine Pleuropneumonia. OIE, 2004.
14. Wesonga HO, Bölske G, Thiaucourt f, Wanjohi C, Lindberg R. Experimental Conagious Caprine Pleuropneumonia: A long Term Study on the Course of Infection and Pahtology in a Flock of goats Infected with *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* *Acta vet. Scand.* 2004; 45:167-179.
15. Aluja AS. Un brote de pleuroneumonía en cabras, causado por *Mycoplasma mycoides*. *Med Vet Zoot.* 1964; 111:77-87.

16. Ciprian-Carrasco JA. Aislamiento y caracterización de micoplasmas a partir de pulmones neumónicos de ovinos y caprinos en México (Tesis de Maestría). Distrito Federal, México; UNAM, 1979.
17. Hernández AL, López J, Ontiveros CL, Jiménez GN. *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* Associated with goat respiratory disease and high flock mortality. *Can. Vet. J.* 2006; 47:366-369.
18. Otero N.J., Jaramillo M.L., Quintero MMT. Asociación de *Railletia caprae* y la presencia de micoplasmas en cabras. XXVIII Congreso nacional de Buiatría; 2004: Asociación Mexicana de médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC, 2004.
19. Corona Vargas José Luis., Estandarización de las pruebas de Fijación de Complemento y Aglutinación Indirecta para el diagnóstico de micoplasmosis caprina asociadas a problemas respiratorios en México. (Tesis de Licenciatura) Distrito Federal, México; UNAM, 2007.
20. Conrad J., Krass., Max W. Gardner., Etymology of term *Mycoplasma*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1973;23:62-64.
21. Whitford HW, Rosenbusch RF, Lauerman LH. *Mycoplasmosis in Animals: Laboratory Diagnosis*. 1a ed. Iowa (USA): Iowa State University Press, 1994.
22. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN), actualizado el 14 de Septiembre de 2005 (bajado el 08 de diciembre de 2009). Disponible en <http://www.bacterio.cict.fr/mr.html>
23. Madanat A., Zendulková D., Pospíš Z. CONTAGIOUS AGALACTIA OF SHEEP AND GOATS. A REVIEW *Acta Vet. Brno* 2001;70:403-412.
24. De la Fe C., Gutiérrez A., Poveda J.V., Assunção P., Ramírez A.S., Fabelo F. First isolation of *Mycoplasma capricolum* subsp *capricolum* one of the causal agents of

- caprine contagious agalactia on the island of Lanzarote (Spain). *Vet J.* 2007;173:440-442.
25. Guiadini, N.D., Petridou, E.J., Sofianidis G., Filioussis G., Psychas, V., Hatzopoulou E., Karatzia H. Mortality in adult goats attributed to *Mycoplasma capricolum* subspecies *capricolum*. *Vet. Rec.* 2008;163:278-279.
26. Manso-Silvan L., Viles E.M., Sacase K., Djordjevic S.P., Thiaucourt and Frey J. *Mycoplasma leachii* sp. nov. as a new species designation for *Mycoplasma* sp. bovine group 7 of Leach, and reclassification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC as a serovar of *Mycoplasma mycoides* subsp. *Capri*. *Int J syst Evol Microbiol.* 2009;59:1353-1358.
27. Shlomo Rotten., Interaction of Mycoplasma with Host Cell. *Physiol Rev.* 2003;83:417-432.
28. Joseph S. Hogan. Laboratory handbook on bovine mastitis; Published 1999 by National Mastitis Council in Madison, WI.
29. Edward DG, Freundt EA. The classification and nomenclature of organisms of the pleuropneumonia group. *J Gen Microbiol.* 1956;14:197-207.
30. Antunes NT, Tavio MM, Assunao P, Rosales Rs, Aquili V, De la Fe C, Poveda JB. *In Vitro* susceptibilities of field isolates of *Mycoplasmas mycoides* large colony type to 15 antimicrobials *Vet Microbiol.* 2007;119:72-75.
31. Nicholas R.A.J. Contagious Caprine Pleuropneumonia. *Ivis* [serial online] 2002 agosto 13: Available from: [URL:http://www.ivis.com](http://www.ivis.com).
32. Santo I. Arbiza Aguirre; Producción caprina, 1^a. Ed., México D.F., Ed. Agt Editor S.A., 1986:82-90.

33. Tully JG, Clyde, Senterfit. *Mycoplasma* Techniques course: Preparation of *Mycoplasma antisera*. Bordeaux: International Organization for Mycoplasmaology (IOM). 1983.
34. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9^a ed. USA: Williams & Wilkins, 1994.
35. Thiaucourt F., Lorenzon S., David A., Breard A. Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster as show by sequencing of a putative membrane protein gene. *Vet. Microbiol.* 2000; 72:251-268.
36. Al-Momami W., Mahmoud A., Halablab, Mahmoud N., Abo-Shehada, Katie Miles, McAuliffe A., Nicholas A.J.R. Isolation and molecular identification of small ruminant mycoplasmas in Jordan. *Small rum res.* 2006;65:106-112.
37. Sheehan M., Markey B., Cassidy J., Ball H. J., Duane M., Doherty M.L., New Transtracheal bronchoalveolar lavage technique for the diagnosis of respiratory disease in sheep. *Vet, Record.* 2005;157:309-313.
38. Valdivieso-Garcia A, Rosendal S. Variation in size of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* isolated form goats *Vet Rec.* 1982; 110:470-471.
39. Awan M.A., Abbas F., Yasinzai M., Nicholas R.A.J., Babar S., Ayling R.D., Attique M.A., Ahmed Z. Prevalence of *Mycoplasma capricolum* subspecies *capricolum* and *Mycoplasma putrefaciens* in goats in Pishin district of Balochistan. *Pakistan Vet. J.* 2009;29:179-185.
40. Verbisck-Bucker G., González-Candela M., Galián j., Cubero-Pablo M. J., Martin-AtanceP., León-Vizcaíno L., Epidemiology of *Mycoplamsa Agalactiae* infection in free-ranging Spanish Ibex (*capra pirenaica*) in Andalusia, Southern Spain. *J Wildl Dis.* 2008;44:369-380.

41. Belloy L., Janovsky M., Vilei M. E., Pilo P., Giacometti M. Molecular Epidemiology of *Mycoplasma conjunctivae* in Caprinae: Transmission across Species in Natural Outbreaks. *Appl., Environ. Microbiol.* 2003;69:1913-1919.
42. El Hassan S.M., Harbi MS., Abu Bakr MI. Treatment of contagious caprine pleuropneumonia. *Vet Res Comm*, 1984; 8:65-67.
43. Sánchez A., Contreras A., Corrales JC., Marco J. Epidemiología de la infección intramamaria caprina; *World Animal Review* 89-1997/2.
44. Contreras A., Luengo C., Sánchez, J.C. Corrales. The role of intramammary pathogens in dairy goats. *Liv. Prod. Sci.* 2003;79:273-283.
45. De la Fe C., Sánchez A, Gutiérrez A, Contreras A, Corrales JC, Assunção P, Poveda C, Poveda JB. Effect on goats milk quality of the Presence of *Mycoplasma* spp. In herds without symptoms of contagious agalactia J. *Dairy Res.* 2009;76:20-23.
46. Tardy F., Mercier P., Solsona M., Saras E., Poumarat F. *Mycoplasma mycoides* subs. *mycoides* biotype large colony isolates from healthy and diseased goats: Prevalence and typing. *Vet. Microbiol.* 2007; 10:10-16.
47. DaMasa, A.J., Brooks D.L. The external ear canal of goats and other animals as a *Mycoplasma* habitat. *Small rum res.*1991; 4:85-93.
48. Pitcher D.G., Nicholas R.A.J., *Mycoplasma* host specificity: Fact or fiction? *Vet J.* 2005;170:300-306.
49. Robert A, Smith DVM, Feedlot Diseases and Their Control. 23 Congreso Mundial de Buiatria, Québec, Canadá 11-16 de julio 2004. [serial online 2004] Available from: URL: <http://www.ivis.org/proceedings/wbc/wbc2004/WBC2004-Smith-simple.pdf>.

9.0 APÉNDICES

APÉNDICE 1

Medio de cultivo líquido Hayflick¹

| | | |
|-------------------------|-------|-----|
| Caldo PPLO ² | 1.89 | gr. |
| Agua destilada | 90.00 | ml |

1. Esterilizar en autoclave³ a 121 °C/15 lb/15 minutos.
2. El siguiente paso es agregar los siguientes elementos del medio:

| | | |
|---|---------|-------|
| Rojo de fenol ^a al 1 % | 0.25 | ml |
| Glucosa ^b al 10 % | 1.00 | ml |
| Suero de equino ^b | 20.00 | ml |
| Extracto de levadura ^c al 10 % | 10.00 | ml |
| Penicilina G sódica | 100 000 | UI/ml |

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

^b Esterilizar por filtración con membranas⁴ de 0.22 µm.

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

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

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

² PPLO broth Difco

³ Autoclave AESA

⁴ Membranas MILLIPORE

APÉNDICE 2

Medio de cultivo sólido Hayflick.

Preparar 60 ml de medio líquido Hayflick (Apéndice 1).

Agar noble¹ al 0.8 %

| | | |
|------------|------|---|
| Agar noble | 0.56 | g |
|------------|------|---|

| | | |
|----------------|-------|----|
| Agua destilada | 10.00 | ml |
|----------------|-------|----|

1. Esterilizar el agar en autoclave a 121 °C/15 lb/15 minutos.
2. Dejar que el agar se entibie para poder mezclar con el medio líquido.
3. Verter 7 ml de la mezcla en cada caja de petri sin crear burbujas y dejar solidificar.

1. Agar noble Lab Difco