



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**“TIPIFICACIÓN DE MICOPLASMAS AISLADOS DE BOVINOS CON  
PROBLEMAS RESPIRATORIOS EN MÉXICO”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS EN LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL**

**PRESENTA:  
VERÓNICA ROJAS TREJO**

**TUTORA:  
DRA. ROSA ELENA MIRANDA MORALES  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA-UNAM**

**MIEMBROS DE COMITÉ TUTOR:  
DR. FRANCISCO J. TRIGO TAVERA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA-UNAM**

**M en C. LAURA JARAMILLO MEZA  
CENID-MICROBIOLOGÍA INIFAP**

**MÉXICO D. F.**

**2013**



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.

## ABREVIATURAS

( - )	Negativo
( + )	Positivo
μc	Micrómetro
μg	Microgramo ('s)
μl	Microlitro ('s)
A	Adenina
ARN	Ácido Ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
BH-1	Herpesvirus Bovino tipo 1
C	Citosina
c.b.p.	Cuanto baste para
CPA	Comisión México - Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales
CRB	Complejo Respiratorio Bovino
DVB	Diarrea Viral Bovina
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de Magnesio
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> : Ácido desoxirribonucleico
DNTP	Di-nucleótido trifosfato
EBB	Epitelio bronquial bovino
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> . Ensayo inmuno enzimático
FMVZ	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
G	Guanina
IOM	Organization of Mycoplasma
IBR	Rinotraqueítis Infecciosa Bovina
Kb	Kilo base
LC	<i>Large colony</i> : colonia grande
LPSN	List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature Nomenclatura de asignación de Nombres a Procariontes
M	Molar (solución molar)
<i>Mmm SC</i>	<i>Mycoplasma mycoides</i> sub sp <i>mycoides</i> Small Colony
<i>Mmmc</i>	<i>Mycoplasma mycoides</i> sub sp <i>mycoides capri</i>
NAD	Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina
°C	Grados centígrados
OPP	Oligopéptido Permeasa
OIE	Organización Mundial de sanidad Animal
P	Proteínas
PBS	Solución buffer fosfatos
PCB	Pleuroneumonía Contagiosa Bovina
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PG	Phosphatidylglycerol: Fosfatidilglicerol
PI3	Parainfluenza tipo 3
pH	potencial de Hidrogeno
PPLO	Organismos tipo Pleuroneumonía
Ps	Proteínas de Superficie
PTS	Phosphoenolpyruvate: Fosfoenolpiruvato fosfotransferasa

RCS	Recuento Celular Somático
RPOB	Gen que codifica la subunidad beta de la ARN polimerasa
SAGARPA	Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación
SC	<i>Small colony</i> : Colonia pequeña
T	Timina
Taq	<i>Termus aquaticus</i>
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
VSP	Proteínas Variables de Superficie
VSRB	Virus Sincitial Respiratorio Bovino
WAHID	World Animal Health Information System: Sistema Mundial de datos Zoosanitarios

## INDICE

<b>DEDICATORIA .....</b>	<b>6</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>7</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>8</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>10</b>
<b>1.0 INTRODUCCION .....</b>	<b>10</b>
1.1 Problemas respiratorios en bovinos .....	11
1.1.1 Etiología .....	11
1.1.2 Problemas respiratorios en bovinos por micoplasmas .....	12
1.2 Generalidades de micoplasmas .....	14
1.2.1 Características micoplasmas: .....	14
1.2.2 Sistemas de transporte .....	15
1.2.3 Genoma .....	15
1.2.4 Manifestaciones clínicas de micoplasmosis respiratorias .....	17
1.2.5 Lesiones.....	17
1.3 Factores de virulencia .....	18
1.3.1 <i>Mycoplasma bovis</i> :.....	18
1.3.2 <i>Mycoplasma dispar</i> .....	22
1.3.3 <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> .....	22
1.3.4 Daño celular durante la unión de micoplasma y célula huésped.....	25
1.4 Transmisión.....	26
1.5 Distribución .....	26
1.5.1 Mundial.....	26
1.5.2 México.....	28
1.6 Epidemiología .....	28
1.7 Diagnóstico .....	28
1.8 PREVENCIÓN Y CONTROL.....	29
1.9 Situación actual de México.....	29
<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>30</b>
<b>2.0 HIPÓTESIS .....</b>	<b>31</b>
<b>3.0 OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
3.1 OBJETIVO GENERAL .....	31
3.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	31
<b>4.0 MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
4.1.1 Zona de Muestreo .....	32
4.1.2 Tamaño de muestra .....	32
4.1.3 Colección de Muestras.....	33
4.2 Procesamiento de las muestras .....	33
4.3 Identificación de Género .....	35
4.4 Tipificación Bioquímica.....	36
4.5 Propagación de los aislados .....	38
4.6 Extracción de ADN.....	38

4.7 Técnicas moleculares para las diferentes especies de Micoplasmas .....	39
4.7.1 Análisis de secuencias y diseño de iniciadores.....	39
4.7.2 Estandarización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ...	46
4.8 ANALISIS BACTERIOLÓGICO .....	50
4.9 ANALISIS ESTADISTICO .....	52
<b>5.0 RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
5.1 Aislamientos de <i>Mollicutes</i> .....	53
5.1.1 Aislamiento de <i>Mycoplasma</i> en los diferentes grupos de estudio .....	53
5.1.2 Correlación de la presencia de <i>Mycoplasmas</i> y la presencia de signología clínica en los hatos en estudio .....	54
5.1.3 Tipificación bioquímica de las diferentes especies de <i>Mycoplasmas</i> ... ..	55
5.2 Optimización de las técnicas moleculares.....	56
5.2.1 <i>Mycoplasma bovis</i> .....	56
5.2.2. <i>Mycoplasma dispar</i> .....	57
5.2.3 <i>Mycoplasma mycoides</i> .....	58
5.3. Resultados de las diferentes técnicas de PCR .....	61
5.4 Resultados de la tipificación bioquímica y molecular .....	61
5.5 Concordancia entre las dos técnicas realizadas para la tipificación de especies de Micoplasmas. ....	62
5.6 Aislamiento bacteriológico y la correlación con <i>Mycoplasma</i> sp. ....	63
<b>6.0 DISCUSIÓN .....</b>	<b>66</b>
6.1 Identificación de <i>Mycoplasma</i> spp. ....	66
6.2 Correlación de la presencia de <i>Mycoplasmas</i> y la presencia de signología clínica en los hatos en estudio .....	67
6.3 Tipificación bioquímica de especies de <i>Mycoplasma</i> spp .....	67
6.4 Aislamiento bacteriológico y la correlación con <i>Mycoplasma</i> spp .....	69
6.5 Identificación molecular de los aislados de <i>Mycoplasma</i> spp. ....	71
6.6 Concordancia entre las metodologías de identificación. Bioquímica y molecular de los aislados de <i>Mycoplasma</i> spp.. ....	72
<b>7.0 CONCLUSIONES .....</b>	<b>73</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>74</b>
<b>APÉNDICE.....</b>	<b>86</b>

## DEDICATORIA

Dedico este trabajo a:

-Mis padres:

**Enrique:** Porque eres la mejor persona que la vida puso a mi lado GRACIAS por todo el amor, comprensión y apoyo que incondicionalmente siempre me brindaste, en todas las decisiones que yo tome en la vida y además ayudarme a cumplir mis sueños. Eres el mejor papá que nadie pudo tener. Te amo papá.

**Eva:** Con todo mi corazón, por darme la vida, siempre serás mi mamá aunque el destino no nos permitió estar tan juntas, aun así te quiero mucho.

-A mis Hermanas:

**Mireya:** Por ser la hermana que siempre nos cuida además me apoya, eres importante en vida y siempre seremos amigas, toda la vida y aún más por siempre seguiremos juntas.

**Karina:** Eres mi hermanita que me enseña a luchar, a ser razonable que me escucha, me quiere, me soporta y siempre me apoya en todos los aspectos de la vida, además de ser mi gran orgullo.

Las dos son mis mejores amigas, soy muy dichosa de tenerlas a mi lado.

-A mis sobrinos:

**Carlos Alexis y Frida Alexandra:** Ambos son la luz de mi vida, iluminaron mi ser desde que nacieron la llenaron de esperanza y sentido, cada día los amo más, siempre contarán con mígo pase lo que pase, gracias por existir y darme fuerza para luchar.

- A **Rolando**, Por tener siempre fe en mí, por ser mí apoyo infinito, mi fuerza cuando más lo necesito, por estar siempre a mi lado en las buenas y las malas gracias por amarme tanto.

Te amo.

Mientras mi familia este a mi lado no habrá imposibles.

## AGRADECIMIENTOS

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

A los miembros de mi Comité Tutor:

- Doctor Francisco Trigo Tavera por apoyarme una vez más en este proyecto.

- Dra. Laura Jaramillo Meza, Por sus consejos y enseñanzas durante este proyecto.

A los miembros de mi jurado:

- Dr. Francisco Suárez Gûemes.

- Dr. Miguel Ángel Blanco, Dr. Miguel Ángel Quiroz

- Dr. Efrén Díaz Aparicio

- Dra. Susana Mendoza Elvira

Su opinión fue para enriquecer este trabajo.

A mis excelentes profesores que enriquecieron mi trabajo y educación en especial al Dr. Mosqueda Gualito, Dr. Antonio Verdugo, Dr. Rogelio Alonso, etc.

A mis compañeros de laboratorio de Micoplasmas fue lindo trabajar con ustedes, Martha Juárez, Marlenne Maya, Fabiola Ávila, Tania Molina, Ulises Nader Najera, Cuauhtémoc López, Joseline y Liliana Tapia.

A todos los integrantes del departamento de Microbiología e Inmunología que siempre me brindaron una sonrisa, un abrazo o palabras de aliento. Lab. Micología (Dra. Carolina Segundo) Lab. de Preparación de Medios y Reactivos, Lab. De Tuberculosis-Brucellosis, Laboratorio de Vacunología, Lab. Microbiología molecular, ya finalmente a Lupita y Rosy dos personas que nos ayudan a todos y son motor del departamento de Mel.

A mis amigos Juan Nava, Analia, Alicia, Jovani y a Erandi.

Agradezco a mis amigos y amigas, los que a pesar del tiempo que no pude compartir, siguen atentos a nuestra amistad.

Al apoyo de beca CONACYT número: 52933

Al proyecto PAPITT IN-222412-3 y PAPIIT IN 219909-3 DGAPA-UNAM por el financiamiento de este proyecto.



## RESUMEN

ROJAS TREJO VERÓNICA. Tipificación de Micoplasmas aislados de bovinos con problemas respiratorios en México. (Bajo la dirección de Dra. Rosa Elena Miranda Morales, M en C Laura Jaramillo Meza y Dr. Francisco J. Trigo Tavera).

Las enfermedades del sistema respiratorio son una causa importante de enfermedad y muerte en ganado bovino, principalmente en animales jóvenes, proceso que puede ser causado por un grupo de patógenos bacterianos y virales. Entre las bacterias involucradas encontramos a *Mycoplasma* spp. *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* e *Histophilus somni*. Las principales especies de micoplasmas que han sido involucradas a problemas respiratorios son, *Mycoplasma bovis* y *Mycoplasma dispar*, aunque existen reportes de otras especies involucradas como *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma* del grupo *mycoides* y *Mycoplasma arginini*. En este trabajo se realizó el aislamiento y tipificación bioquímica de especies de micoplasmas, de 310 muestras de hisopos nasales y 64 de pulmones de bovinos, provenientes de animales sanos y con problemas respiratorios de zonas productoras lecheras en México y de rastro para los pulmones aparentemente sanos, se tipificaron los aislados de Micoplasmas por medio de la PCR, aunado a esto realizó la bacteriología para buscar a *Pasteurella*, *Mannheimia* e *Histophilus* spp., Los resultados del estudio mostraron a 122 (33%), muestras positivas a *Mycoplasma* spp, donde el 89 % de ellas provenían de animales con signología respiratoria. De las muestras positivas se obtuvo un total de 141 aislados, los cuales fueron identificados mediante pruebas bioquímicas como, 54 *M. bovis*, 36 *M. dispar*, 17 *M. mycoides*, 8 *M. californicum*, 2 *M. arginini*, 1 *M. bovigenitalium*, 1 *M. alkalecescens* y 10 restantes como *Mycoplasma* spp. Con la PCR se caracterizaron a 56 aislados como *M. bovis*, 35 como *M. dispar* y 22 para el grupo *Mycoides* las 16 restantes resultaron identificados como *Mycoplasma* spp., Al realizar la concordancia entre las metodologías con el valor de Kappa de Cohen, se observó que para *M. bovis* y *M. dispar* se presentó una buena concordancia entre la tipificación bioquímica y molecular, excepto para la identificación del grupo *mycoides*. Al realizar la bacteriología de las muestras se

logró identificar a *Pasteurella* spp., en 22 (5.8 %), *Mannheimia* sp 18 (4.8 %) e *Histophilus* spp., 2 (0.5 %). Lo cual no mostró correlación con las muestras positivas a *Mycoplasma* spp., mediante la prueba de correlación de Spermán. Finalmente los resultados obtenidos en esta investigación coinciden con los recientes reportes de establecer la presencia de las especies de *Mycoplasma* spp., como agentes involucrados en problemas respiratorios en unidades de producción lechera en México y así tomar medidas de prevención y control de dichos patógenos.

## ABSTRACT

The respiratory system diseases are a major cause of death and disease in cattle, especially in younger animals, processes which can be caused by a group of bacterial and viral pathogens. Among the bacteria involved are *Mycoplasma* spp. *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* and *H. somni*. *Mycoplasma* species that have been involved primarily with respiratory problems are, *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma dispar*, although there are reports of other species related as *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma mycoides* and *Mycoplasma arginini*. In this work, the isolation and biochemical characterization of mycoplasma species was done, with 310 nasal swabs and 64 bovine lungs, all obtained from healthy animals and with respiratory problems from the two major milk producing areas in Mexico, and from slaughterhouses. The apparently healthy lungs were typified for the isolates of *Mycoplasma* by PCR, coupled with this bacteriology studies were performed to search for *Pasteurella*, *Mannheimia* and *Histophilus* spp. The results identified 122 (33%) samples positive to *Mycoplasma* spp, where 89% of the samples were from animals with respiratory signology. 141 isolates were obtained from the positive samples, which were identified by biochemical test as 54 *M. bovis*, 36 *M. dispar*, 17 *M. mycoides*, 8 *M. californicum*, 2 *M. arginini*, 1 *M. bovirhinis*, 1 *M. alkalescens* y 10 remaining as *Mycoplasma* spp. PCR isolates identified 56 as *M. bovis*, 35 *M. dispar* and 22 as *Mycoplasma* spp, the 16 were identified as *Mycoplasma* spp. When the correlation between the methodologies with Cohen Kappa value, there was a good concordance for *M. bovis* and *M. dispar* between biochemical and molecular tests, except for the identification of the *mycoides* group. When performing bacteriology test, it was possible to identify *Pasteurella* spp, in 22 samples (5.8%), *Mannheimia* spp in 18 (4.8%) and *Histophilus* spp in 2 (0.5%). This showed no correlation with positive samples to *Mycoplasma* spp., by Spearman correlation test. Finally the results of this research agree with recent reports for establishing the presence of species of *Mycoplasma* spp. as agents involved in respiratory problems in dairy production units in Mexico, for the control and prevention of these pathogens.

## **1.0 INTRODUCCION**

### **1.1 Problemas respiratorios en bovinos**

Las enfermedades respiratorias en bovinos causan grandes pérdidas económicas en las explotaciones ganaderas, por disminución de la ganancia de peso, alto riesgo de transmisión a otros animales, elevados costos de tratamientos y pérdida de reemplazos de alta genética productiva (Olguín 2007). Diferentes autores mencionan que los animales en edad temprana, de 1 a 5 meses, son mayormente propensos a neumonías y que pueden presentar signología marcada con tos, descargas nasales, epífora, depresión, flujo nasal de tipo catarral ó purulento. La cronicidad de la enfermedad puede conducir a una falta de desarrollo corporal para llegar a la edad adulta (Trigo 1987, Pijoan *et al.*, 1999, Quiroz 2000, González 2007). Así mismo, Pijoan *et al.*, 1999, indican que en Estados Unidos las enfermedades neumónicas puede ser la principal causa de morbilidad de 80 hasta 90 % y con una mortalidad en becerras de 25 %, esto se traduce en pérdidas económicas cercanas a los 800 millones de dólares anuales. En México, se informa que la incidencia y prevalencia de las neumonías en becerras pueden alcanzar cifras de 24 hasta un 50 % durante la crianza (González 2007). En un estudio realizado por Pijoan *et al.*, 1999, en hatos lecheros de la zona de Baja California indicaron que los costos por problemas respiratorios van de \$ 83.25 a los \$ 501.41 por becerro y los costos indirectos por esta enfermedad oscilan entre los \$ 235.12 a los \$ 301.07 de pesos mexicanos.

#### **1.1.1 Etiología**

Los principales agentes infecciosos involucrados en los procesos respiratorios son bacterias y virus. Las bacterias asociadas son: *Mycoplasma spp*, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* e *Histophilus somni*; mientras que, los agentes virales son: Virus Sincitial Respiratorio Bovino (VSRB), Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR), Parainfluenza 3 (PI3), Diarrea Viral Bovina (DVB) y Herpesvirus Bovino tipo 1 (BH-1). Existen otros factores anatómicos de la especie bovina (como: la capacidad respiratoria, pleura poco distensible, ángulo traqueo-bronquial casi recto, etc.) además de situaciones estresantes que afectan al

animal, debido a su contexto multifactorial, se ha considerado a la enfermedad como un Complejo Respiratorio Bovino (CRB). Actualmente, se le ha otorgado una mayor importancia a los micoplasmas como agentes causales de problemas respiratorios en los bovinos, las evidencias que sustentan esta afirmación es el frecuente aislamiento del microorganismo en pulmones de becerros con neumonía, (Nicholas 2003). Se ha observado en diferentes partes del mundo el aislamiento de varias especies de *Mycoplasma* del Complejo Respiratorio bovino como se muestra en el cuadro 1 (Nicholas *et al.*, 2008).

**Cuadro 1. Bacterias relacionadas al Complejo Respiratorio Bovino, porcentajes de aislamiento de hisopos nasales de bovinos con problemas respiratorios**

Referencia	<i>M. Bovis</i>	<i>M. dispar</i>	<i>M. arginini</i>	<i>M. bovirhinis</i>	<i>M. bovisgenitalium</i>	<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Mannheimia haemolytica</i>	<i>Histophilus somni</i>
Bednare D et al., 2012 Polonia	76.7							
Soehnen Mk et al., 2011 EUA	28.9					12.2		
Knudtson et al., 2006 EUA	36	39		8.5				
Muenster et al., 1979 EUA		56						
Gabinaitiene A et al., 2011 Lituania	72.7	8.5						
Chazel M et al., 2010 Francia	55		12	12				
Mar-ques L et al., 2007 Brasil		6,1						
Gagea M et al., 2006 Canadá	82		72	1				
Hai-nes et al., 2001 Canadá	80					23		14
Thomas A et al., 2002 Bélgica	45.5	1	1					
Brice et al., 2000 Irlanda						8.4	20.6	4.2
Ter Laak et al., 1992 Países Bajos	20	92	16	88	4			
Bindert et al., 1990 Alemania	36					62	62	

### 1.1.2 Problemas respiratorios en bovinos por micoplasmas

Diferentes especies de micoplasmas se consideran patógenas para los bovinos, puesto que pueden por si solas o asociadas a otros microorganismos producir diversas enfermedades, tales como: neumonías, mastitis, artritis, otitis media, otitis y externa (asociado a ectoparásitos en oído), orquitis, infertilidad, conjuntivitis, abortos e infertilidad (Nicholas RAJ 2003).

Las principales especies que afectan al ganado bovino son: *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma dispar*, *Mycoplasma mycoides* subsp *mycoides* SC (Mmm SC), *Mycoplasma californicum*, *Mycoplasma canadense*, *Mycoplasma bovirhinis*; *Mycoplasma alkalescens* y *Mycoplasma arginini*. Siendo las primeras tres especies las de mayor relevancia en los problemas respiratorios de los bovinos.

En 1898 Nocard y Roux describieron por primera vez a los micoplasmas, al demostrar que la pleuroneumonía contagiosa bovina, enfermedad altamente infecciosa, era causada por microorganismos que crecían en medios de cultivo libres de células, capaces de atravesar los filtros que retenían bacterias. Con esto lograron establecer a *Mycoplasma* como microorganismo capaz de producir enfermedad respiratoria. La presencia e importancia de *Mycoplasma bovis* es comúnmente menospreciado en los hatos bovinos, pese a que existe amplia información que lo relaciona con problemas respiratorios y poliartritis, principalmente en becerras menores de 120 días de edad. Históricamente, el microorganismo ha sido referenciado en los Países Bajos asociado a procesos neumónicos en ganado de engorda por Ter Laak *et al.*, 1992, en Francia, Byrne *et al.*, en Inglaterra, Le Grand *et al.*, en 2001, reportaron 30% y 25 % respectivamente de animales seropositivos a *M. bovis* en hatos con problemas respiratorios. Mientras que, Nicholas *et al.*, también en el 2001, detectaron anticuerpos en la mitad de 55 hatos con problemas respiratorios estudiados en gran Bretaña. Tschopp *et al.*, 2001, confirmó la importancia de *M. bovis* luego de que en el 54% de 415 terneros en hatos de engorda, desarrollaron enfermedad de las vías respiratorias atribuibles a *M. bovis*. Asimismo, se reportan otras especies de micoplasmas asociadas en problemas respiratorios tal como lo mencionó Gabinaitiene *et al.*, 2011, en pulmones neumónicos, identificó a *M. bovis* junto con *M. dispar*, en animales jóvenes que son trasladados a lugares fríos o que son expuestos a un estrés por movilidad.

Howard en 1983 en Inglaterra mencionó la presencia de *M. bovis* y *M. dispar* como agentes patógenos frecuentemente aislados en problemas neumónicos en bovinos Marques *et al.*, 2007, identificaron a *M. dispar* por medio de la PCR en 6.16 % en animales sanos y en un 35% de animales con problemas respiratorios. Todo esto

indica la importancia de aislar y tipificar las diferentes especies de *Mycoplasmas* implicados en patologías respiratorias, como es el caso de *Mycoplasma mycoides* subsp *mycoides* SC, que es un patógeno que ocasiona la Pleuroneumonía Contagiosa Bovina (PCB), la cual es una enfermedad altamente patógena que se presenta en forma aguda, subaguda y crónica causando daños pulmonares graves en hatos bovinos, con una morbilidad y mortalidad hasta del 100 % en Europa, Asia y principalmente África. Por lo tanto se encuentra clasificada en la lista de enfermedades exóticas de reporte obligatorio emitida por el Diario Oficial de la Federación de México en septiembre del 2007 (SAGARPA) y desde 1994 la OIE (Organización Mundial de sanidad Animal) exige a todos los países reportar los casos positivos de PBC.

Estos trabajos resaltan la importancia de las especies *M. bovis*, *M. dispar* y *Mycoplasma mycoides* sub sp *mycoides* SC asociados al complejo respiratorio bovino, no obstante en México la información al respecto es escasa y su relevancia epidemiológica y socioeconómica se desconoce.

## **1.2 Generalidades de micoplasmas**

### **1.2.1 Características micoplasmas:**

La principal característica de los micoplasmas es su carencia de pared celular, debida a su incapacidad para sintetizarla, por lo que son resistentes a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, además de ser sensibles a los cambios osmóticos. Están constituidos de una membrana trilaminar compuesta por proteínas, glicoproteínas, glicolípidos, fosfolípidos y esteroides que le proveen una mayor estabilidad osmótica, miden de 10 a 500  $\mu\text{m}$  de diámetro (Wight *et al.*, 1999, Rottem 2003).

### **-Requerimientos nutricionales y de cultivo**

Son llamados microorganismos fastidiosos por la dificultad de aislamiento en laboratorio, esto hace que los medios de cultivo necesiten enriquecerse con suero equino que le aporta los esteroides y ácidos grasos, la glucosa para el aporte energético, levadura para el aporte de vitaminas y ácidos nucleicos. El medio base PPLO (Organismos asociados a la Pleuroneumonía), que les aportan las

peptonas de carne para el aporte de aminoácidos y nitrógeno que requieren. Se utiliza también el medio de cultivo semisólido para poder observar las colonias bacterianas que en una concentración de agar de 0.8-1 % las colonias se aprecian con la morfología típica de “huevo frito” (Tully - Razin 1970), forma umbilicada la apariencia que se observa por la alta densidad en la parte central del medio y menor densidad en la periferia de la colonia (Smith 1971).

### **1.2.2 Sistemas de transporte**

*Mycoplasma*, cuenta con tres principales sistemas de transporte en la membrana citoplasmática, estos son el sistema de transporte tipo ABC, que consiste en un grupo de proteínas que poseen un dominio conservado de aproximadamente 200 aminoácidos, llamado “ATP-binding-cassette“, constituido por proteínas periplásmicas, permeasas y proteínas que se encuentran adosadas a la membrana dentro del espacio periplásmico, este sistema transporta principalmente monosacáridos, oligopéptidos y algunas vitaminas. Cabe mencionar que las secuencias que codifican para las proteínas de este sistema están filogenéticamente conservadas, por lo cual son blanco para la identificación de especies de micoplasmas, mediante técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando iniciadores específicos del dominio ABC.

El segundo sistema de traslocación de grupo o de las fosfo transferasas PTS (fosfoenolpiruvato fosfotranferasa) donde los azúcares son fosforilados durante su transporte, este se asemeja al sistema de Gram positivas y el tercer sistema de transporte, difusión facilitada, la que contiene una proteína acarreadora que hace pasar sobre todo precursores de ácidos nucleicos (Razin *et al.*, 1998)

### **1.2.3 Genoma**

El genoma de los micoplasmas es de alrededor de 600 a 2,200 Kb, correspondiente a 600-800 genes, que es el mínimo necesario para tener vida independiente. Éste presenta un bajo contenido de guanina y citosina, entre 23-40% y es rico en adenina y timina, hasta un 70 %, Además utilizan un código



genético alternativo, donde el codón TGA codifica el aminoácido triptófano en lugar de la habitual señal de paro de las procariontas (Nicholas *et al.*, 2008, Dybvig *et al.*, 1996).

Cottew *et al.*, 1987, demostraron que algunas especies de micoplasmas están filogenéticamente altamente relacionadas, siendo clasificadas dentro del mismo grupo “*mycoides*”, esta relación está clara con las pruebas bioquímicas convencionales, reacciones inmunológicas, hibridación del ADN, análisis de la secuencia de genes del ARNr 16S por medio de la técnica de PCR (Thiaucourt *et al.*, 2000; Nicholas 2002), es así, que la identificación de estas especies se dificulta ya que no pueden ser diferenciados bioquímicamente, además de presentar reacción cruzada con antisueros policlonales dirigidos contra los diferentes miembros del grupo (Taylor *et al.*, 1992).

Los ribosomas de estos microorganismos presentan las características típicas de las procariontas, con un coeficiente de sedimentación 70S, con tres tipos de ARN ribosomal, (5S,16S y 23S), en estas estructuras especialmente en la 16S ARNr existe un alto grado de conservación en las secuencias nucleotídicas en la Clase *Mollicutes*, por ello se utiliza como marcador filogenético para la diferenciación de los géneros *Mycoplasma* y *Acholeplasma*, aunque presenta la desventaja de contar con un gran número de copias en un genoma, lo que puede provocar o conllevar a la identificación de secuencias o marcas moleculares múltiples en un solo organismo (Razin 1984).

Para evaluar el impacto de dicha heterogeneidad intragenómica en el rendimiento del gen 16S rRNA como marcador molecular, se comparó su evolución filogenética y características a las del gen de la subunidad beta de la RNA polimerasa (*rpoB*) altamente conservado también, pero con una sola copia dentro del genoma. Por lo que el gen *rpoB* ahora se utiliza para tipificar especies bacterianas sobre todo aquellas genéticamente conservadas, como es el caso del género *Mycoplasma* e incluso dentro del grupo de *M. mycoides* (Nicholas *et al.*, 2008).

#### **1.2.4 Manifestaciones clínicas de micoplasmosis respiratorias**

El Periodo de incubación de la micoplasmosis puede ser entre 20 y 123 días.

En general la infección por micoplasmosis se ha caracterizado por desarrollar 3 estadios diferentes.

1.- Enfermedad septicémica, 2. Diseminación por sangre seguida por inflamación de cavidades y articulaciones. 3. Enfermedad, daño local de los sistemas respiratorio y genital principalmente.

Una vez infectado el animal la signología es aparente, ya que el animal se muestra deprimido, no come, presenta fiebre, tos, taquipnea y mientras evoluciona el proceso infeccioso el animal evidencia cada vez mayor dificultad respiratoria, con la boca abierta, cuello y cabeza extendidos y los codos separados con el objeto de disminuir el dolor torácico e incrementar la capacidad pulmonar, por la nariz se elimina flujo nasal, en el caso que exista septicemia en las vacas se puede producir poliartritis crónica.

Las especies de micoplasmas pueden ocasionar la disfunción celular en el tejidos por la liberación de metabolitos como los iones peróxido, súper-óxido fosfolipasas, ureasas, proteasas, hemolisinas y nucleasas que dañan de forma localizada la integridad de la membrana celular del huésped (Tenk 2005), por lo que se presentan fibrosis, necrosis, exudados con infiltración de macrófagos y neutrófilos. (Nicholas 2003, Ayling 2003).

#### **1.2.5 Lesiones**

Las lesiones macroscópicas y microscópicas de las neumonías por micoplasma varían poco según la especie de *Mycoplasma* o incluso la cepa involucrada en el proceso infeccioso. En general, las lesiones macroscópicas que se observan son áreas de consolidación craneoventral, puede presentarse necrosis multifocal, pleuritis, bronquiectasia y depósitos fibrinosos caseosos. En la pleuroneumonía contagiosa, producida por *M. mycoides* subsp. *mycoides* small colony type (*MmmSC*), la afectación pulmonar es frecuentemente unilateral, desarrollándose en el pulmón afectado todos los estadios de inflamación, acúmulo de fibrina, adherencias pleurales, líquido claro o de color amarillo, marrón, conteniendo fragmentos de fibrina (Nicholas y Ayling 2003). En especial *MmmSC*, produce

engrosamiento y consolidación de los septos alveolares, los tabiques interlobulillares se observan ensanchados lo cual confiere al pulmón un aspecto marmoleado, estos tabiques se encuentran edematosos e infiltrados de fibrina. En los pulmones afectados es frecuente la presencia de secuestros, el pericardio puede presentar las mismas lesiones que las producidas en la pleura con acúmulo de una gran cantidad de líquido, puede haber presencia de fibrina en determinadas articulaciones, microscópicamente se verifica un importante edema inflamatorio de tabiques interalveolares, trombosis vascular, infiltración mononuclear, perivasculares y peribronquiolares (Guerrieri 2003, Nicholas *et al.*, 2008).

Las lesiones microscópicas producidas por *M. bovis* son descritas como áreas o focos de necrosis coagulativa rodeadas por células mononucleares con degeneración linforeticular. Adegboye *et al.*, 1995, categorizaron en 4 etapas las lesiones producidas por este microorganismo:

- 1.- Microabcesos compuestos por macrófagos y neutrófilos, desarrolladas en el lumen terminal de los bronquiolos.
- 2.- Incremento de neutrófilos y macrófagos en el lumen bronquial (acúmulo de células en la pared de los bronquios) y el comienzo de manguitos (acumulo de células en la pared de los bronquios) de células mononucleares.
- 3.- Ruptura del epitelio bronquial, infiltración de neutrófilos y macrófagos, incrementando la acumulación y la encapsulación de éstas.
- 4.- La pérdida del epitelio es característica de los focos de necrosis coagulativa donde se encuentran algunos micoplasmas, tal como lo hace *M. bovis*.

### **1.3 Factores de virulencia**

#### **1.3.1 *Mycoplasma bovis*:**

-Adherencia

El principal factor de patogenicidad de los micoplasmas es la capacidad que tienen para adherirse al tejido del hospedero y su facultad de diseminación causando una respuesta general exacerbada por la inflamación y el daño por la citotoxicidad provocada, para así poder colonizar los diferentes epitelios (Pilo *et*

*al.*, 2007). Rottem 2003, menciona que el contacto íntimo de los micoplasmas con la membrana de la célula epitelial favorece la hidrólisis de los fosfolípidos presentes en esta última, iniciándose la cascada de traducción de señales específicas capaces de liberar enzimas citolíticas que pueden alterar la integridad de la membrana de la célula huésped.

Sachse *et al.*, 2000, describen en sus experimentos la cinética de adhesión, especificidad e interacción de la proteína P26 de *M. bovis* con los residuos de ácido siálico y sulfátidos actuando como receptores en la célula epitelial del hospedero, Sachse *et al.*, 1993, Minion 2002 observaron que en anillos traqueales de bovinos, *M. bovis* no se adhiere específicamente a las células epiteliales de la tráquea como lo hace *M. pneumoniae* y *M. dispar* (Howard *et al.*, 1987, Rodríguez *et al.*, 1996), el papel que describen de la proteína P26 es que ayuda a la adhesión a nivel de bronquios a diferencia de los micoplasmas mencionados (Sachse *et al.*, 1993).

Thomas *et al.*, 2003, analizaron citoadherencia de diferentes cepas de *M. bovis* en cultivos primarios de células del epitelio bronquial bovino (EBB), donde se observó que la adherencia de las cepas se inhibía con anticuerpos monoclonales dirigidos a las lipoproteínas variables de superficie VspC y VspF, no obstante, el porcentaje de inhibición varió con la cepa y la proteína de superficie involucrada. Estos estudios comprueban que *M. bovis* se adhiere a las células del epitelio bronquial favoreciendo su multiplicación en ese sitio anatómico.

#### -Variación antigénica

Se ha observado que los micoplasmas pueden evadir el reconocimiento por parte del sistema inmune del hospedador por medio de la modificación de sus epitopos superficiales, proceso que es llamado variación antigénica, este mecanismo de evasión la presenta diferentes especies de micoplasma principalmente en las lipoproteínas de superficie. Las especies mayormente estudiadas y en las cuales se ha comprobado este mecanismo de evasión son *M. pulmonis*, *M. genitalium* en humanos, *M. gallisepticum* en aves y, *M. bovis*, *Mmm SC* y *M. agalactiae* en bovinos (Razin *et al.*, 1998, Minion 2002, Pilo *et al.*, 2007). Este mecanismo

proporciona al patógeno un medio para sobrevivir a un súbito cambio ambiental o como se comentó antes a evadir la respuesta inmune de hospedero. Finalmente el que estas variaciones sean reversibles, conducen a un amplio rango de fenotipos antigénicos en micoplasmas (Sache *et al.*, 2000).

En el caso particular de *M. bovis* se ha identificado una familia de proteínas de superficie variables (Vsp), hasta el momento se han descrito 13, éstas presentan alta variabilidad de fase, poseen un sistema ON/OFF para la activación o inactivación de la expresión de genes que finalmente se observan como un cambio fenotípico (Lysnyansky *et al.*, 1996; Lysnyansky *et al.*, 1999, Minion 2012). Nussbaum *et al.*, 2002 demostraron que cepas de campo de *M. bovis*, poseen versiones modificadas del complejo Vsp resultado de la amplia variación que ocurre en las secuencias de los genes estructurales, en comparación con la cepa control PG 45; señalando una gran capacidad de variación antigénica dentro de las estirpes de *M. bovis* dentro de una población animal, cinco proteínas Vsp se han identificado con estos cambios: VspA, VspB, VspC, VspF y VspO (Sachse *et al.*, 2000). Estas estructuras de la superficie son los objetivos principales de la respuesta de anticuerpos, por lo tanto, la capacidad de un microorganismo a cambiar rápidamente el repertorio antigénico de superficie, acarrea como consecuencia evitar el reconocimiento inmunológico. Por lo que las Proteínas de superficie en Micoplasmas son de suma importancia, ya que se han identificado con anticuerpos de epítomos específicos para estas moléculas de la familia VSP de cepas patógenas de *Mycoplasma bovis* involucradas a la adherencia en el epitelio indica a P26 (VSP) como una proteína de adherencia. Así, se ha demostrado que en cultivos de células embrionarias de pulmón de bovino anticuerpos inhiben parcialmente citoadherencia por la P26 (Sachse *et al.*, 2000). Otra función de las VSP de *Mycoplasma bovis* es la posible evasión de la opsonización por anticuerpos específicos (Sachse *et al.*, 2000, Razin *et al.*, 1998).

#### -Toxicidad

Geary *et al.*, 1981, obtuvieron una toxina inflamatoria mediante extracción etanólica al 75% de una suspensión de células de *M. bovis*. La toxina parcialmente

caracterizada es una glicoproteína de 73 kDa, localizada en la membrana citoplasmática, ellos observaron que sólo la porción polisacárida era tóxica, de igual modo, se determinó que la toxina aislada produce inflamación en la glándula mamaria y en la piel de los cobayos, mediante un incremento en la permeabilidad vascular de los capilares.

#### -Formación de Biopelícula

Las biopelículas son comunidades microscópicas que consisten esencialmente de agregados que forman capas finas en diversas superficies; estos complejos no sólo están conformados por células microbianas. Además del biopolímero extracelular que producen los microorganismos, se ha demostrado que diversas especies de micoplasmas forman biopelículas en superficies inertes.

McAuliffe, *et al.*, 2006, mencionan que *M. bovis* es capaz de producir biofilm de 20 a 48 horas de post incubación, característica que le permite sobrevivir en medio ambiente, además de presentar resistencia a diferentes antibióticos evento importante en la patogénesis bacteriana (McAuliffe *et al.*, 2006, Fuentes-García G *et al.*, 2008)

#### -Peróxido de Hidrogeno

*M. bovis* y otras especies de este género son capaces de producir peróxido de Hidrógeno y superóxido que tienen la capacidad de dañar la integridad de la membrana de la célula epitelial, al tiempo que inactivan la catalasa y la superóxidodismutasa de la propia. El peróxido de hidrógeno es un metabolito tóxico liberado como resultado de la oxidación del glicerol en algunos micoplasmas fermentativos que presentan flavoproteínas, glicerol 3-fosfato oxidasas, o por la oxidación de NAD (Megid 2001, Gyles *et al.*, 2011).

### **1.3.2 *Mycoplasma dispar***

#### **-Adherencia**

Para *M. dispar* la información sobre sus factores de patogenicidad es escasa, no obstante, se menciona la presencia de cápsula compuesta por polímeros de ácido poligalacturónico, lo que le confiere propiedades antifagocíticas (Minion 2002). Para el tipo de cápsula que presenta *M. dispar* se describen cualidades como la adherencia y un efecto inhibitor en la respuesta inmune de los macrófagos alveolares bovinos evitando que estos produzcan TNF- $\alpha$  e Interleucina 1 (Almeida 1992), además de la inhibición de la actividad de los cilios (ciliostasis), reduce la eficiencia respiratoria y predispone al aparato respiratorio a la infección por diferentes microorganismos oportunistas (Howard 1983, Gyles *et al.*, 2004).

*M. dispar* se adhiere específicamente a las células epiteliales de la tráquea a diferencia de *M. bovis*, (Howard *et al.*, 1987, Rodríguez *et al.*, 1996).

#### **-Cápsula**

La cápsula de *M. dispar*, posee características antifagocíticas para los macrófagos alveolares. Como Almeida *et al.*, 1992 lo demostraron al purificar la cepa de *M. dispar* capsulada la respuesta de los macrófagos fue mejor al enfrentarse con cepa sin cápsula.

#### **-Peróxido de Hidrogeno**

Howard *et al.*, 1974, observaron lesiones neumónicas en pulmón de becerras y el efecto citopático en un cultivo de tráquea fetal bovina, por el efecto de la producción de peróxido de Hidrogeno de *Mycoplasma dispar* inoculado por vía respiratoria.

### **1.3.3 *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides***

#### **-Adherencia**

La cápsula que poseen algunas especies de micoplasmas tiene un papel fundamental en la adherencia (Biberstein *et al.*, 1990), al igual que, ciertas

proteínas de membrana que facilitan la adhesión a los eritrocitos (hemoadsorción) (Razín *et al.*, 1998). Es el caso de *MmmSC*, ya que uno de sus factores de virulencia es la cápsula compuesta de galactano, estructura que contribuye a la adherencia a las células huésped y a la evasión de la fagocitosis, se cree que tiene un efecto toxico directo y por su similitud con el galactano del tejido pulmonar de los bovinos sigue la exacerbada respuesta inmune que se observa en esta infección en el tracto respiratorio. Los receptores sobre la membrana de la célula epitelial son los responsables de que los micoplasmas se puedan adherir y están identificados como sialoglicoconjugados y glicolípidos conjugados (Razin 1985; Razin *et al.*, 1998).

#### -Variación antigénica *M. mycoides*

*MmmSC*, presenta una Vsp llamada Vmm, proteína que tiene una función supuesta hasta ahora de adherencia, los cambios se realizan por ON/OFF y al estudiarse, se observaron deleciones o inserciones en las regiones repetitivas de secuencias de aminoácidos que conforman la proteína aunque no se asegura la función principal de esta (Minion 2012).

#### -Peróxido de hidrógeno y superóxido

Los micoplasmas producen potentes toxinas que ocasionan alteraciones en la integridad de la célula epitelial, así como peróxidos, superóxidos, enzimas hidrolíticas, fosfolipasas, ureasas, proteasas, hemolisinas y nucleasas (Razin *et al.*, 1998, Nicholas *et al.*, 2008).

Los productos del metabolismo de los carbohidratos en micoplasmas como el peróxido de Hidrogeno y radicales superóxido, son metabolitos que se van incrementando al igual que el daño celular de tipo oxidativo y que son capaces de dañar la integridad de la membrana, causando en el proceso citotoxicidad en la célula huésped característica que desarrolla *MmmSC* (Pilo *et al.*, 2007, Nicholas *et al.*, 2008).



#### -Toxicidad de *M. mycoides*

*M. mycoides* subsp *mycoides* LC tiene citolicinas que inducen una actividad similar a las endotoxinas, pero con un efecto diferente al LPS. La citolisina es obtenida por lisis celular mediada por calor (Rosendal *et al.*, 1995). Dentro de del preparado se encuentran una gran cantidad de enzimas hidrolíticas que degradan los componentes celulares del hospedero. Las más notables son las nucleasas, las que hidrolizan rápidamente los ácidos nucleicos celulares, liberando los precursores requeridos para la replicación y síntesis de los mismos de la célula microbiana (Razin *et al.*, 1998).

#### -Galactano

El galactano (polisacárido capsular) compuesto por 6-*O*- $\beta$ -D- Galactofuranosyl- D-galactosa, aumenta la virulencia en el grupo *mycoides*, (Pilo *et al.*, 2007). Los bovinos, ovinos y cabras reaccionan ante el galactano de los micoplasmas con edema pulmonar y en algunos casos trombosis capilar. El galactano que presenta *M. mycoides* SC, se reporta como causa de efectos inmunopatológicos en la PCB y efectos citopáticos, conduce a la contracción de vasos sanguíneos provocando trombosis aumentando el edema pulmonar y la salida de fibrina de los vasos sanguíneos a la cavidad torácica, además de generar o apoyar la persistencia y diseminación de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC, en el tracto respiratorio (Rosendal 1993, Pilo *et al.*, 2007, Nicholas *et al.*, 2008).

#### -Proteínas de superficie.

Principalmente las lipoproteínas muestran un rol importante en la patogenicidad, ya que son la principal interacción entre el micoplasma y la célula huésped (adhesión), consideradas altamente antigénicas para realizar serodiagnóstico y producción de vacunas, estimulantes del sistema inmune ya que funcionan como proteínas proinflamatorias, como las lipoproteínas LppA y LppQ, esta última con secuencias altamente conservadas en cepas Africanas y virulentas de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC, por lo que se utiliza para el

diagnóstico serológico mediante la técnica de ELISA autorizada por la OIE (Pilo *et al.*, 2007).

-Biopelículas:

No se ha demostrado que *MmmSC* produzca biopelícula, aunque por ahora esta particularidad se ha observado en *M. bovis*, *M. fermentans*, *M. pneumoniae*, *M. cotewii*, *M. capricolum*, *M. ovipneumoniae*, *M. putrefaciens*, *M. yeatsii* y *M. penetrans*, característica que se considera un factor de virulencia y evento importante en la patogénesis bacteriana (McAuliffe *et al.*, 2006, Fuentes-García *et al.*, 2008)

#### **1.3.4 Daño celular durante la unión de micoplasma y célula huésped**

Cuando los micoplasmas se adhieren a la célula huésped, ocurren eventos donde las fosfoproteínas de reconocimiento se unen a los receptores celulares que se polimerizan, formando estructuras fibrilares que se extienden lateralmente hacia el centro de la célula microbiana (Rottem 2003).

Los micoplasmas son capaces de fusionarse con la célula epitelial del hospedero, pese a esta habilidad hasta ahora se sigue considerado un microorganismo extracelular. Estos microorganismos, presentan un conjunto de mecanismos para desarrollarse a expensas de las células vivas y causan daño celular al hospedero. Entre estos mecanismos encontramos la competencia por precursores biosintéticos (lípidos o ácidos nucleicos), daño por la citoadherencia, algunas especies inducen efectos citopáticos y mutaciones (Rottem 2003). La producción de proteasas por los micoplasmas, tiene un papel fundamental en el proceso de colonización y persistencia de la enfermedad, ya que le permite evadir la respuesta inmune mucosal. La principal enzima de este tipo es la IgA1-proteasa, una serina proteasa, que hidroliza a la IgA de las mucosas, lo que constituye una forma de evitar la eliminación de los microorganismos por opsonización (Rottem 2003).

Durante el proceso de fusión entre los micoplasmas y la membrana plasmática de la célula epitelial, los componentes citosólicos del microorganismo son

descargados en el interior de la misma. Dentro de estos componentes se encuentran una gran cantidad de enzimas hidrolíticas que atacan y degradan los componentes celulares, las más notables son las nucleasas que hidrolizan rápidamente los ácidos nucleicos celulares, liberando los precursores requeridos para la replicación y síntesis de los mismos en la célula microbiana (Razin *et al.*, 1998). Los efectos citopáticos que se caracterizan por vacuolización y reorganización del citoesqueleto son, debidos a la internalización y multiplicación de los micoplasmas en el citosol u en los organelos celulares. Esta vacuolización puede estar dada por la producción de peróxidos orgánicos, puesto que algunos agentes antioxidantes como el  $\alpha$ -tocoferol evitan la aparición de este efecto citopático (Maniloff 2002, Rottem 2003).

#### **1.4 Transmisión**

En general, para patógenos bacterianos implicados en enfermedades multifactoriales, el riesgo de infección y de desarrollo de la enfermedad clínica depende de un gran número de factores del patógeno, del huésped y del medio ambiente. Las vías de transmisión son por contacto directo mediante aerosoles, secreciones nasales, vaginales, conjuntivales, calostro y leche contaminada de animales portadores y/o enfermos (Maunsell 2009).

El caso particular de *MmmSC* se transmite principalmente por aerosoles. Aunque este agente también se ha encontrado en orina, membranas fetales y descargas uterinas. Los animales portadores, como el ganado bovino infectado de forma subclínica, pueden retener organismos viables en lesiones pulmonares encapsuladas llamados secuestros. Los animales portadores pueden seguir eliminando principalmente cuando son sometidos a episodios de estrés (OIE 2010).

#### **1.5 Distribución**

##### **1.5.1 Mundial**

La distribución de *M. bovis* se reporta en todo el mundo principalmente asociada a problemas de mastitis aunque también se señala en problemas respiratorios sobre

todo en animales jóvenes. Desde 1898 Nocard y Roux, reportaron como agente causal de la pleuroneumonía contagiosa bovina a un agente filtrable, llamándolo organismo de la pleuroneumonía, lo que representó el primer aislamiento de *Mycoplasma* spp., en bovinos (Bradbury 2005). En 1950 se propuso el nombre de *Mycoplasma*, el cual proviene del griego mykes (hongo) y plasma (forma) (Edward *et al.*, 1956). Fue aislado por primera vez en 1961 en U.S.A, a partir de un caso de mastitis severa en ganado bovino (Hale *et al.*, 1962), debido a su gran similitud serológica y bioquímica con *M. agalactiae* fue designado originalmente como *M. agalactiae* var *bovis*, desde entonces parece haberse propagado a numerosos países, a causa de la movilización de animales. Se ha reportado ya en Inglaterra en 1975 por Thomas *et al.*, Canadá 1977, Langford en Escocia 1978, EUA, Ose *et al.*, 1979, Holanda 1992 Ter Laak, Irlanda Byrne *et al.*, 2001, Alemania Hewicker-Trautwein *et al.* 2003, Inglaterra McAuliffe *et al.*, 2004, últimos aislamientos de *M. bovis*, en el Reino Unido e Irlanda, fueron de fetos abortados y de cerebros de animales que mostraban signos neurológicos y otitis, sugiriendo un papel importante en varias patologías aún mayor de lo que se pensaba anteriormente. Se reporta a *Mycoplasma dispar* como causante de problemas respiratorios desde 1974 en Inglaterra Howard NR *et al.*, 1977, en el mismo año en Japón Kuniyasu *et al.*, en Francia Tinant *et al.*, 1979, Canadá Martin *et al.*, 1990, New York 1996 por Virtala *et al.*, Londres Megid *et al.*, 2001, Bélgica 2002 Thomas *et al.*, y finalmente en Brasil por Marques *et al.*, 2007.

*MmmSC* es un microorganismo catalogado como endémico en la mayor parte del África, además está presente en parte de Asia, sobre todo en la India y China, aunque se producen brotes periódicos en algunas partes de Europa mediterránea (Portugal, España e Italia), en mayo 2009 la OIE publica el listado de los países que se pueden considerar como libres pero aun en observación, de acuerdo con las disposiciones de la OIE, que hasta la fecha menciona a los siguientes países como libres, Australia, Estados Unidos de América, Portugal, Botsuana, India y Suiza (WAHID-OIE 2011)

### **1.5.2 México**

Actualmente existe el acuerdo de la Comisión México - Estados Unidos para la Prevención de Enfermedades Exóticas de los animales (CPA) acerca de que nuestro país, debe informar a la OIE sobre el entorno zoonosanitario del país en cuanto a la situación de *MmmSC* ya que hasta la fecha no hay reportes que demuestren la presencia o ausencia de este microorganismo en el país, hecho que es trascendental en los tratados de libre comercio, suscritos con otros países que obligan a tomar medidas necesarias para garantizar el intercambio comercial de los animales, sus productos y subproductos, siempre y cuando cumplan con las medidas sanitarias nacionales e internacionales, por lo tanto es necesario que México informe mediante procedimientos de diagnóstico capaces de diferenciar entre *MmmSC* de distintas infecciones bovinas causadas por otras especies de micoplasmas, para poder clasificarse como libre de PCB por *MmmSC* (CPA SAGARPA 2008, Diario Oficial SAGARPA 2008).

### **1.6 Epidemiología**

*Mycoplasma* spp., afecta a los bovinos de diferentes edades siendo más susceptibles animales jóvenes que puede presentar una morbilidad del 80 % al 90 % excepto la especie de *MmmSC* que afecta a (*Bos taurus*) como a cebúes (*Bos indicus*) existiendo una distinta susceptibilidad entre ellas, aunado a estos animales se ha observado el microorganismo en bisontes y yaks causando una morbilidad de hasta el 100 % y una mortalidad de 30 al 50 % (WAHID-OIE 2011).

### **1.7 Diagnóstico**

Actualmente se trabaja con diferentes muestras de animales para el diagnóstico, pero se necesita de equipo y reactivos específicos además de la experiencia en este proceso para poder llevar a cabo el aislamiento y la identificación las especies de micoplasmas. Esta identificación se puede realizar por serología o técnicas moleculares como los diferentes tipos de PCR, aunque estas últimas hasta ahora se tienen como metodologías de investigación, y se recomiendan por la especificidad y sensibilidad inherentes de las pruebas. Y ya que en la

micoplasmosis algunos animales no presentan signología aparente o los signos clínicos no son patognomónicos por lo que es importante recalcar la importancia de la tipificación final. Existen pocos laboratorios que se encarguen del monitoreo de micoplasmosis ya que en los hatos donde existen animales positivos pueden resultar negativas por la recurrencia de la enfermedad aunado a lo fastidioso del cultivo y los costos que este representa (Maunsell 2009, Jaramillo 2009).

### **1.8 Prevención y Control**

La incapacidad de la quimioterapia para controlar las infecciones por *Mycoplasma spp.*, ha centrado la atención sobre la producción de vacunas para la prevención pero sorprendentemente en la actualidad no hay vacunas disponibles. En Europa, se desarrolló una vacuna inactivada tetravalente que contenía el virus sincitial respiratorio, parainfluenza tipo 3 y dos especies de micoplasmas, *M. dispar* y *M. bovis*, que mostró poca protección contra la enfermedad respiratoria en campo aunque solo se ha probado en algunos hatos de países Europeos (Howard *et al.*, 1987). Los resultados recientes de la evaluación sobre las opciones para evitar la micoplasmosis sugieren que la mejor medida de control es mantener los hatos cerrados. Establecer estrictamente las cuarentenas de los animales adquiridos, pasteurizar adecuadamente la leche y el calostro suministrado a los becerros y el control de animales infectados o positivos a micoplasmosis, aunado al monitoreo constante en hatos positivos (Jaramillo 2009).

### **1.9 Situación Actual de México**

En México se realizó la identificación por inmuohistoquímica en pulmones con lesiones de bovinos provenientes de algunos estados del norte de la república Mexicana, (Ramírez *et al.*, 2010), con anterioridad Jaramillo *et al.*, 1986 realizaron el aislamiento de *Mycoplasma bovis* de neumonías de becerros. (Congreso Nacional de Buiatría 1987), son los únicos reportes de micoplasmas asociados a problemas neumónicos; no obstante, brotes de mastitis bovina por *M. bovis* fueron descritos en nuestro país en hatos lecheros localizados en el municipio de Zumpango Estado de México por Ávila *et al.*, 1983 y Hernández *et al.*, 1984. Más

de veinte años después se informó de nuevos casos de mastitis involucrando esta especie de micoplasma en muestras de leche de tanque (Rojas *et al.*, 2008), igualmente se detectó anticuerpos contra *M. bovis* en muestras de suero sanguíneo proveniente de hatos lecheros localizados en los Estados de Coahuila, Hidalgo y México mediante un ELISA comercial (Nuñez *et al.*, 2008), más recientemente Delgado en el 2010 informa sobre el aislamiento de *M. bovis* en casos de neumonía y otitis en becerros Holstein.

Para *Mmm* SC no existen reporte alguno, pero el Comité Internacional aprobó las Normas recomendadas para los sistemas de vigilancia epidemiológica de la perineumonía contagiosa bovina propuestas por la Comisión para la Fiebre Aftosa y Otras Epizootias (ahora denominada Comisión Científica para las Enfermedades de los Animales) en 1999 determinó los requisitos que deben cumplir los Países Miembros para declararse provisionalmente libres de perineumonía contagiosa bovina o para solicitar ser oficialmente reconocidos libres de la enfermedad por la OIE. *M. dispar* no ha sido identificado en el país como agente etiológico de enfermedades en ganado nacional.

## **JUSTIFICACIÓN**

En un contexto de sanidad animal, bienestar y economía en los hatos pecuarios, en México no se tiene clara la información acerca de la micoplasmosis bovina, no se conoce que especies están involucradas en los procesos respiratorios por lo que es necesario evaluar la situación de la micoplasmosis de población bovina en México, así como en las zonas de producción lechera, por medio de estudios que determinen antes que nada la presencia o ausencia del microorganismo, con la finalidad de establecer metodologías diagnósticas capaces de diferenciar las principales especies asociadas a enfermedades respiratorias en bovinos, para establecer medidas adecuadas del manejo y control de los animales que puedan ser portadores de la enfermedad y afectar la salud de los animales, producción y ganancias económicas

## **2.0 HIPÓTESIS**

*Mycoplasma bovis* y *Mycoplasma dispar* son las principales especies de micoplasmas asociadas a problemas respiratorios en ganado bovino, en unidades de producción láctea en México.

## **3.0 OBJETIVOS**

### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Aislar e identificar bioquímica y molecularmente las principales especies de *Mycoplasma* involucradas en los problemas respiratorios infecciosos de los bovinos en centros de producción lechera ubicados en la República Mexicana.

### **3.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Aislar y tipificar bioquímicamente especies de *Mycoplasma* spp., a partir de muestras de hisopos nasales de bovinos sanos y con problemas respiratorios.
- Diseñar iniciadores específicos y estandarizar la PCR, para la identificación de las especies de *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma dispar* y *Mycoplasma mycoides*.
- Tipificar molecularmente por medio de la PCR los aislamientos de micoplasmas obtenidos de las muestras de bovinos con problemas respiratorios.
- Identificar mediante aislamiento y pruebas bioquímicas a las bacterias relacionadas con el Complejo Respiratorio, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* e *Histophilus somni*.



## 4.0 MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1.1 Zona de Muestreo

Para el estudio, se tomaron muestras de bovinos con problemas respiratorios de unidades de producción láctea, ubicadas en la zona de Tizayuca, Hidalgo y en la región de la Laguna entre los estados de Durango y Coahuila (SIAP- SAGARPA 2008), asimismo se colectaron pulmones procedentes de animales que murieron por problemas neumónicos y muestras de animales aparentemente sanos de rastro.

### 4.1.2 Tamaño de muestra

Para estimar el tamaño de la muestra de los hisopados nasales se realizó un estudio piloto en la zona de Tizayuca con un total de 138 muestras de hisopos nasales de animales provenientes de hatos con problemas respiratorios, con los resultados y según la fórmula de muestreo no probabilístico intencional se determinó el número de muestras para el análisis.

$$n = \frac{Z^2 p \cdot q}{d^2}$$

Donde:

N = Número de muestras

Z $\alpha$  = Nivel de confianza deseado Z

d = Error máximo permitido o esperado

p = Probabilidad de éxito o prevalencia establecida

q = 1 - p

Estudio Piloto

-158 muestras

-42 % Positivos al aislamiento de micoplasmas

-58 % Negativos al aislamiento de micoplasmas

Considerando un 95 % de confianza

$$n = \frac{1.96^2 (0.42)(0.58)}{(0.05)^2} = \frac{3.8416 (0.2436)}{0.0025} = 374 \text{ Muestras}$$

Tamaño de muestra: El número total de muestras colectadas fue de 374, donde 310 muestras fueron hisopos nasales de animales sanos y con problemas respiratorios, 14 muestras de pulmón de animales que murieron por problemas respiratorios y 50 pulmones de animales aparentemente sanos tomadas en rastro. Las diferentes zonas de muestreo se menciona en el cuadro 4.1.

**CUADRO 4.1 -Muestras colectadas en las diferentes zonas de estudio.**

MUESTRAS Y SITIO DE MUESTREO	
PULMÓN RASTRO ESTADO DE MÉXICO	50
PULMÓN EDO. HIDALGO	14
HISOPO NASAL EDO. HIDALGO	191
HISOPO NASAL TORREÓN Y DURANGO	119
TOTAL	374

#### **4.1.3 Colección de Muestras**

Se colectaron dos hisopos de exudado nasal por animal, uno de ellos se introdujo en tubos de tapón de rosca conteniendo medio de cultivo Hayflick para el aislamiento de micoplasmas, mientras que el otro se colocó en medio Stuart para el análisis bacteriológico general, ambos fueron transportados al laboratorio en condiciones de refrigeración y mantuvieron así hasta su procesamiento.

Los pulmones neumónicos fueron colectados con la debida asepsia posible en el rastro durante el corte de la canal, o durante la necropsia según el caso.

#### **4.2 Procesamiento de las muestras**

##### **Aislamiento de Micoplasmas**

Para el aislamiento de micoplasmas se utilizó el medio de cultivo Hayflick modificado (Hayflick, 1965) (Apéndice ), fundamentado en el medio indicado por Edward en 1947 que contiene medio base (PPLO), infusión cerebro corazón de bovino, peptonas de carne, extracto fresco de levadura y suero de caballo.

La muestra de exudado nasal se trabajó de acuerdo a la metodología establecida por Tully *et al.*, 1983, donde los tubos conteniendo las muestras en medio de

cultivo Hayflick se incubaron<sup>1</sup> por 12 h a 37 °C (primocultivo). Después de la incubación se tomaron del primocultivo 30 µl y se depositaron en medio semisólido Hayflick (Apéndice ) para incubarse de 2 hasta 7 días en microaerobiosis<sup>1</sup> a 37° C con un 80-85 % de humedad; asimismo, se tomó del primocultivo un volumen de 200 µl de la muestra y se depositaron en 1.8 ml de medio de cultivo Hayflick líquido. Se realizaron diluciones decimales (de 10<sup>-1</sup> hasta 10<sup>-4</sup>), las diferentes diluciones se incubaron en aerobiosis a 37° C de 24 a 48 h. Los cultivos se revisaron diariamente para observar cualquier cambio de pH y/o turbidez, aquellos que presentaron alguna de las dos reacciones, se sembraron en placas de medio semisólido. En el caso de las diluciones que no mostraron cambio de pH y/o turbidez se realizó a los 7 días un pase ciego de 200µl a 1.8 ml de medio fresco de Hayflick líquido, este procedimiento se efectuó hasta por 4 veces para considerar una muestra como negativa (Howard *et al.*, 1994). Las placas con medio semisólido fueron observadas con un microscopio estereoscópico<sup>2</sup> cada 24 h durante 30 días máximo o hasta observar la morfología típica de Micoplasmas “Huevo Frito” (Tully *et al.*, 1983).

#### **- Purificación de la cepa**

A partir de una colonia típica de micoplasma se realizó la metodología de clonación triple que consistió en tomar una colonia de la placa de agar semisólido con una pipeta Pasteur que se depositó en medio líquido y fue incubado de 24 a 48 h. Posteriormente el cultivo se resembró en medio de cultivo semisólido para poder observar la morfología de la o las diferentes colonias bacterianas de micoplasma. Este proceso se llevó a cabo en tres ocasiones para confirmar la morfología típica y lograr un cultivo puro, ya que se observó en el primocultivo el desarrollo de dos a tres colonias diferentes en una muestra (Howard *et al.*, 1994).

---

<sup>1</sup>Incubadora FISCHER SCIENTIFIC

<sup>2</sup>Microscopio CARL ZEISS

### 4.3 Identificación de Género

Para la identificación de género *Mycoplasma* spp., se realizaron las pruebas de filtración, no reversión de formas “L” y sensibilidad a la digitonina. Todas las pruebas fueron realizadas utilizando los aislados frescos de 24 h. de crecimiento. Howard *et al.*, 1994

-Filtrabilidad: Para desarrollar la prueba, se hicieron pasar 2 ml de cultivo por una membrana con poro de 0.45 micrometros<sup>3</sup>, posteriormente se depositó el inóculo en medio semisólido para confirmar que las bacterias son filtrables (Tully 1983).

-No reversión de Formas “L”: Esta prueba se realizó, para confirmar la naturaleza de la clase *Mollicutes* y descartar la presencia de formas L derivadas de otros géneros bacterianos cuya síntesis de pared celular fue inhibida por la presencia de penicilina en el medio de cultivo (Tully 1983).

-Sensibilidad a la Digitonina: La prueba fue realizada para diferenciar a los géneros *Acholeplasma* y *Mycoplasma* pertenecientes a la clase *Mollicutes*, ya que morfológicamente son iguales, se aprovecha la característica de *Mycoplasma* al depender de la presencia de esteroides en el medio de cultivo y su inhibición de crecimiento al no tenerlos, a diferencia del género *Acholeplasma* que no requiere de esteroides para su crecimiento,. La digitonina es un glucósido que disuelve a los esteroides proporcionados en el medio Hayflick. La prueba se desarrolló realizando diluciones decimales  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  del aislado, posteriormente de cada dilución fue tomado un volumen de 20  $\mu$ l para depositarlos en la superficie del medio de cultivo semisólido permitiendo que resbalara la gota en línea recta. Una vez que se dejó secar fue colocado un disco de papel filtro saturado con una solución de digitonina al 1,5%, la placa fue incubada en microaerobiosis a 37° C con el 80-85 % de humedad. Cada 24 h se observó la placa de agar. Una reacción positiva a *Mycoplasma* spp, se consideró al observar un halo de inhibición del crecimiento colonial alrededor del disco de digitonina (Tully 1983, Howard *et al.*, 1994).

---

<sup>3</sup> MILLIPORE

#### 4.4 Tipificación Bioquímica

Para la identificación bioquímica de los aislados de micoplasmas se utilizaron las pruebas indicadas en el Manual Bergey 's de Bacteriología Sistemática 2001 para las especies de *Mycoplasma* de importancia en bovinos, pruebas que se muestran en el cuadro 4.2.

**Cuadro 4.2 Pruebas bioquímicas para la identificación de especies de micoplasmas**

PRUEBAS BIOQUÍMICAS						
	G	M	A	T A/AN	P y M	C
<i>M. bovis</i>	-	-	-	+/+v	+	-
<i>M. alkalescens</i>	-	+	+	-/-	-v	-
<i>M. dispar</i>	+	+	-	+/+	V	-
<i>M. canadense</i>	-	-	+	-/-	-	-
<i>M. bovigenitalium</i>	-	-	-	-/-	V	-
<i>M. mycoides sub mycoides</i>	+	+	-	+/+v	-	+V
<i>M. californicum</i>	-	-	-	-/-	-	-
<i>M. arginini</i>	-	-	+	-	-	
<i>M. bovirhinis</i>	+	-	-	+/+	-	+

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

#### -Fermentación de Carbohidratos:

Los carbohidratos utilizados fueron glucosa y manosa al 50 %, donde se adiciono 1 ml que se adicionaron en el medio de cultivo de Hayflick, la prueba fue realizada depositando 0.5 ml del aislado en 1.5 ml del medio de cultivo adicionado con el carbohidrato determinado, fue incubado 37°C en aerobiósis y se revisó cada 24 h. hasta observar un cambio ácido en el pH ó en el caso de un aislado sin cambio, se incubó incluso 15 días para determinar un resultado negativo (Howard *et al.*, 1994).

-Todas las pruebas fueron realizadas junto con un control positivo y un control negativo, con la finalidad de observar los cambios de pH, en los aislados en estudio.

-Hidrólisis de Arginina: Se realizó inoculando 0.5 ml de cultivo del aislado a 1.5 ml de medio Hayflick adicionado con 0.2 % de Arginina, se incubó 37°C de 24 hrs., hasta 14 días esperando ver el cambio de alcalinización del medio debido a los productos del metabolismo del aminoácido, como el amoniaco, que elevan el pH del medio de cultivo a rojo intenso, de acuerdo al indicador utilizado. Se considera una reacción negativa cuando no se observó un cambio de pH, máximo en un tiempo de 15 días de incubación (Tully 1983, Howard *et al.*, 1994).

-Reducción de Tetrazolio: Se inoculó 0.5 ml del aislado en tubos conteniendo 1.5 ml de medio Hayflick enriquecido con tetrazolio al 2%, asimismo en medio semisólido con el 2 % de tetrazolio se agregó 30 µl del aislado, el medio líquido se incubó a 37 °C desde 1 a 15 días para observar una reacción positiva con un cambio de coloración del medio líquido de color rojo a purpura intenso, de igual modo, color alrededor de las colonias en el medio solido cuando un aislado es positivo, debido a la reducción del 2,3,5-trifenil-tetrazolio durante el metabolismo aerobio y o anaerobio de las especies de micoplasma (Tully 1983, Howard *et al.*, 1994).

-Hidrólisis de Caseína: Para mostrar la proteólisis de la caseína de los aislados se inocularon 30 µl de cultivo de micoplasmas en un medio de cultivo semisólido enriquecido con caseína, a una concentración de 7 partes de medio Hayflick por una de caseína, El inoculó se incubó en microaerobiosis a 37 ° C con 85 % de CO<sup>2</sup>, el resultado se observó como una zona clara debido a la hidrolisis de bajo de la colonia (Howard *et al.*, 1994).

-Películas y manchas: La producción de películas y manchas se observó en el medio de cultivo Hayflick que se utilizó para el crecimiento de los aislados para las pruebas bioquímicas, en esta prueba es aparente la actividad lipolítica de los aislados en el medio de cultivo que contiene el 20 % de suero equino (Howard *et al.*, 1994).

#### 4.5 Propagación de los aislados

Una vez identificados los aislados, se hicieron crecer como lo indica Tully 1983, que menciona, en 2 ml de medio líquido Hayflick se inocularon 200 µl del aislado de *Mycoplasma* se incubaron<sup>4</sup> en aerobiosis a 37°C por 24 a 72 h. Al observar cambio de pH y turbidez, fue aumentado el volumen a 10 ml con medio Hayflick, para volver a incubar y posteriormente adicionar 15 ml, 48 h después la muestra fue centrifugada a 9,300 xg por 45 min para realizar 3 lavados con una solución buffer de fosfatos (PBS) pH<sup>5</sup> 7.2, según lo indica Tully 1983. Una vez que se obtuvo la pastilla bacteriana que se concentró y lavó, se almacenó a -20°C en PBS, para posteriormente realizar la extracción de ADN (Tully 1983).

#### 4.6 Extracción de ADN

Se consideró el protocolo adecuado para micoplasmas el de Tiocianato de Guanidina para realizar la extracción de ADN (Sambrook y Russell 2001).

Para desarrollar esta técnica primero la pastilla bacteriana fue centrifugada<sup>6</sup> 12 000 xg /15 min después se decantó el sobrenadante.

1.- El primer paso fue la lisis celular que se realizó adicionando 500 µl de la solución de Tiocianato de Guanidina a la pastilla de micoplasmas y fue colocada en el vortex para resuspender. Posteriormente se incubó las muestras a temperatura ambiente durante 10 minutos.

2.- El paso siguiente fue agregar 125 µl de Acetato de Amonio e invirtiendo el tubo cuidadosamente unas 5 veces, se incubó a 4°C durante 10 minutos.

3.- Después se agregaron 500 µl de Cloroformo – Alchol Isoamílico y la muestra fue centrifugado 12 000 XG durante 5 minutos, lo que provoca que el cloroformo precipite las sales que fueron utilizadas con anterioridad. Las sales quedaron sedimentadas en el fondo del tubo, en el centro los restos celulares y en la superficie los ácidos nucleicos en una solución acuosa la cual se recuperó en un nuevo tubo.

---

<sup>4</sup> Incubadora FORMA SCIENTIFIC

<sup>5</sup> Potenciómetro COLE-PARMER

<sup>6</sup> Centrifuga THERMO

4.- Al sobrenadante fue agregado 1 ml de Etanol absoluto, para precipitar el ADN, posteriormente se centrifugó y decantó el restante del Etanol.

5.- Finalmente se agregó 1 ml de Etanol 70% para lavar la pastilla centrifugando a 12 000 XG durante 5 minutos, se dejó secar la pastilla durante toda la noche a temperatura ambiente en la campana de flujo laminar.

Para visualizar el producto de la extracción y evaluar la calidad del ADN se corrió la muestra en un gel de agarosa ultrapura Promega al 1 %, 5 µl, del producto y 2 µl, de marcador de peso molecular del fago Lambda. Se corrió a 80 volts durante 35 minutos en una solución de TAE al 1 %. Se evaluó la cantidad de ADN en el Espectrofotómetro<sup>7</sup>.

#### **4.7 Técnicas moleculares para las diferentes especies de Micoplasmas**

##### **4.7.1 Análisis de secuencias y diseño de iniciadores**

Se realizó el análisis bioinformático, de las secuencias del gen que codifica para la oligopéptido permeasa (*oppD* y *oppF*) de *M. bovis*, para el gen de la subunidad beta de la ARN polimerasa (*rpoB*) de *M. dispar* y para el gen del RNA ribosomal 16S (RNAr 16S) del grupo *Mycoplasma mycoides* para el diseño de los iniciadores específicos correspondientes. De igual modo, se analizaron las secuencias descritas por L´Abee-Lund *et al.*, 2001 para la secuencia del gen RNAr 16S para identificar al género *Mycoplasma spp*, el cual se aplicaría a aquellos aislados no identificados.

Todos los iniciadores se analizaron por medio del programa Oligo analyzer 3.1 de Integrated DNA Technologies (IDT) donde se puede observar la temperatura media de cada iniciador, cantidad de Guanina Citocina y mediante la medición de Energia Delta Gibbs o Delta G que es la cantidad de energía que sirve para calcular si una reacción puede ocurrir de forma espontánea como la formación de horquillas o dímeros dentro de las secuencias de los iniciadores

---

<sup>7</sup> Nanodrop ND-1000



**Cuadro 4.3 Iniciadores utilizados para la tipificación molecular**

Especie	Gen	Iniciadores 5'-3'	Producto PCR Pb	Contenido GC %	Temperatura Media °C	Orquilla Delta G Kcal/mol	Dimeros Delta G Kcal/mol
<i>M. bovis</i> AF130119	<i>oppD oppF</i> 2004 pb	F-CTTTTAGCTCTTTTGAACAAAT	1900	26.1	48.2	0.43	-6.34
		R-GGCTCTCATTAAAGAAATGT		42.1	47.8	-0.87	-5.37
<i>M. dispar</i> DQ112172	<i>rpoB</i> 1775 pb	F-GAGTACTTCTCTGGTCTGGAGGTC	548	51.9	59.7	-0.71	-4.67
		R-CAATGGAATTGAATCTGATATTGCCCGC		44.8	59.9	0.05	-5.36
<i>M. mycoides</i> NC005364	<i>ADNr 16S</i> 1527 pb	F-GAGAGTTGATCCTGGCTCAGG	970	54.5	57.3	-1.53	-6.62
		R-CGGGACCATTCCAAGAAGCAC		57.1	58.5	-1.34	-4.64
<i>Mycoplasma</i> spp.	<i>ADNr 16S</i> 1445 pb	F-CTGGCTGTGTGCCTAATACATGC	1370	52.2	58.3	-3.0	-6.21
		R-CTTCGGGCATTACCAGCTCC		60	58.2	-1.02	-6.34

***Mycoplasma bovis*:**

Ya que los iniciadores se tenían previamente diseñados y obtenidos del artículo de Hotzel H *et al.*, 1999, posteriormente, se analizó la secuencia en el programa de National Center for Biotechnology Information (NCBI), con el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST®), para verificar la especificidad de estos iniciadores, la homología, la cobertura y la identidad entre especies que comparte el gen *oppD* y F.

>gi|7248453|gb|AF130119.1| *Mycoplasma bovis* oligopeptide permease D (*oppD*) and oligopeptide permease F (*oppF*) genes, partial cds

```

1 aagcttcagt tttagctctt tttgaacaaa t acgtcaaga gtacaatata tcaataattt
61 taattttcgca taacattagt gttgtcgcta agttttgtga atatattttat gttatgtatg
121 ctggcaaaaat tgttgaaaga ggaactagaa aagatatttt tactaatcca gctcaccctt
181 atacatgagc gcttatctcg gctatacctg aaaatgatga tgagagatta ttctcaattc
241 aaggaacccc accagatatg gcaaacctac ctatcgggtga cctttttgca cctagaaatg
301 actttgcctt agaaattgac tatgaaaaag aaccaccatt aattgaaatt aatagtcatc
361 ataaagcagc aacgtgacta cttcacctg atgcaccaa aatacaaaga ccaaagaat
421 tagaacatag actaaaaagt tttagaaagg tatttaaaga cgatgaagaa taacgacaat
481 aaaaaagtca ttttagaaat tcaagatctt aaaaagtact ttttaaataa cggttaaggtc

```

541 aacaaagctg ttgatggtgt gtcatttaaa ttacatgaag gtgaaatagt cgggtctaatt  
 601 ggtgagtcag gaagtggaaa aaccactggt ggacgttcaa ttctaaggct ttatgacgat  
 661 tttaatgggt ttgttacttt agatgatcaa atcattagcg gagaaagcat ttctaaaaaa  
 721 cgcgaaaagt ttttgcgtaa aagagtgcaa atgatctttc aagatccaca cgcgtcttta  
 781 aacggccaaa aaactatcta tagcattctt aaagaacctt tagttgtcaa taacataatt  
 841 aagcaaaaaa ctgatgatct atttagtgac tgaaaaaaaag ttactgagaa ctttcaattt  
 901 acatTTTTgc tttatgctaa aaagttaaaa attaaaaacc ttaaggcaat taatgagcca  
 961 tctagcacat tttttcctaa atgatcagat agactaattg actttaagtt tgactgggaa  
 1021 aacttatcta ttgatgaaaa ttttgtttct tattttaact acttagaaga aaaacaaaca  
 1081 atggaaagct caattattaa tgagatgtac tcaaacacag atcaattaat ggctttctat  
 1141 tacgaaaagc aagcgcagtt tagaaataat gatgtcactt ttgacgaatt agactatata  
 1201 aatgctacaa aggaactaga attaactaaa aaattatgta agtattcaca aaagcaatat  
 1261 gatgcattaa acaaattaag tgaattagac aaagaattga aagagttaaa aagtaatcaa  
 1321 aatgattatt tattaactaa caaaaacgct ttaataatt ttctttcgga atataagaac  
 1381 gagatcaaaa tttgocgtaa tgcaagatta aatacttacg acatagattt ttactttttt  
 1441 aactataaaa aagagctaac caacaaaata aggttagatg taatcaaaaa atataagtct  
 1501 aagttaagtt atttatcaat agatcaaatt cgtaaattta ttgctgaatt aaacaaatat  
 1561 actaatagtt tttacattga acacttagaa tcaactccaa tttctaaaga ctttaaagca  
 1621 gttgctaagt taataattga atctgattat aactttgatg ttaatgaata tctaaagtta  
 1681 aaccattcta atgaattaga atttaattca gcacttagga atattgaaga ttcaatcaag  
 1741 gctcaaaagg aaattattca ttcaaaagat gaaaaaccag cttttggcaa gaaagaatta  
 1801 gaagctgctg agcaaaaatt ggctaagtct gagaaagttt tcaaagctga aaacgataaa  
 1861 tataacaaaa atattcaaaa tcaaatlaag caattagaca aa**gacattct taatgagagc**  
 1921 **c**ttttatata aaaatttaaa aactcagcaa ggtattaatg atctcaagtt taaaagatt  
 1981 aatgaagcgt tttttgaaaa gctt

***Mycoplasma dispar:***

Se analizó la secuencia del gen *rpoB*, se diseñaron los iniciadores con los programas Oligo analyzer 3; en tanto que, la secuencia producto fue analizada con el programa BLAST®.

Secuencia de *M. dispar* con los iniciadores diseñados.

>gi|73697646|gb|DQ112172.1| *Mycoplasma dispar* strain ATCC 27140 RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene, partial cds

1 ttaatcctct tggtgaaatg gcaaacaaaa gaag**aggttac ttctcttggc cctggaggtc**  
 61 taaatcgtga taccgcccaa tttgaggttc gggatgtgca ctcaactcac tacggtcgaa  
 121 tttgtcctgt tgaaactcct gaaggtcaaa acatcggttt aattcttaat ttttctgttt  
 181 tttcaaaaat caataaatac ggttttatta tcaccocctta ttataaagta acaaatcgcg

```

241 ttgtcgatth taaacaagtt cattgactta cagccgogga agaatacogga ctaagththth
301 cccaatcttc aatcgaaatt gacaaaaaaa atagaattgt tgctgataaa ttaacagthc
361 gaaaaaatca aacttacctt gttcttgact cagaacaagt cgattatata gatgththctt
421 caatgcaaat gacttcaatt tcagcatcag caattcctth tttggaaaat aacgatgcta
481 accgtgogct tatgggttca aacatgcaac gtcaagcagt gccgcttatt aatcagaag
541 caccgcttgt tgcaactgga attgaatctg atattgcccg cththtcagca accaaththac
601 gcgcaaccgt tagtggaata gtagththth thcattcaaa aaaagthcatt athaacgatg
661 gcgaatcaca aaaaathcat taththacgtg cththtgaaa gtccaaccaa gaaacactaa
721 ththtaaaaa accaacagth aaagthggth atgthgtcaa aaaaggacaa cthaththgog
781 atggthcctc aactgacaa ggtgaactth cccttggaat aatgthctt gthgctthca
841 gcacttgata tggthataat tacgaagatg ccatcathth aagcgaaaag cthcgtaaaag
901 acgatgthth tacctcaatt cacaththcag aacaaactat thaatthcogt ththcaaaaag
961 caggaaaogca tgtthtaact gccgaagthc cthathgctc gacaaaatca cgcgcccac
1021 thgatgctaa cggaatogta atogthggth cagaagthga tactggthgat aththtagthc
1081 gaagaacatc gcaaaaagga gaagataatc caaccogthga agaaaatha atggcggcaa
1141 ththgggthaa aaaagcacth gcacaaaag acaththcact thcgtgthaaa aatggthgaag
1201 gcggaaccgt tatogatgth caaththctth thcgcgatca agthgacaa cthcgaagaag
1261 gthgthggaat gctthgthaa atctthgatc ccaaaaaag aaagththaa gthgogcaca
1321 aatggcagth thcggcacgga aataaagthg thgththogat agthctthca gthgaagata
1381 thcogththth agaagacgga actcccogth atgthcogth aaaccogcaa gthgthcctt
1441 cgcgogthga thcogthcaa gththtagaath thcacctthg aatggcagca aaaagathaa
1501 atacaaaath thgcacccca gthththgacg gaaththaaath thgathactatc aaaagththgth
1561 thgcccagthc aathathctc gaathcagga aaththaaath aththgacgga athactgthc
1621 aagctththga gaathcagth thctgthggth atathgthath gthgaaatha caacathgthg
1681 thgatgataa aathgatgca agathcaathc gacctthathc actaacaaca cagcaaccth
1741 tagthggaata atcaaaaath gthgthgcaaa gathc

```

***M. Mycoides subsp. mycoides***: Para las especies del grupo mycoides primero se tomó la secuencia completa del gen que codifica para el gen del RNAr 16S, se diseñaron los iniciadores con la secuencia de *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*, se analizaron con Oligoanalyzer 3.1

>gi|153946368|gb|EU016367.1| *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* 16S ribosomal RNA (rrnB) gene, partial sequence

```

1 aaaatgagag ththgatcctg gthcaggaata aacgctggcg gcatgocthaa thcatgcaag
61 thgaacggag gthgctthgac thcagthggcg aacgggthgag thaacogthath thaacctacc
121 thcatagcggg ggataactth thgaaacgaa agataathacc gcatgthagath ththaththcog
181 catgagaaaa gatcaaaaaga accgththggth thcaththgag athgggthgthc ggcgthathg
241 thagthagthg agataathagc ccacctagthc gatgathacgth agccgaactg agagththgath

```

301 cggccacatt gggactgaga tacggcccag actcctacgg gaggcagcag tagggaattt  
 361 ttcacaatgg acgaaagtct gatgaagcaa tgccgcgtga gtgatgacgg ccttcggggt  
 421 gtaaagctct gttgtaaggg aagaaaaaat aaagtaggaa atgactttat cttgacagta  
 481 ccttaccaga aagccacggc taactatgtg ccagcagccg cggtaataca taggtggcaa  
 541 gcgttatccg gatttattgg gcgtataggg tgcgtagggc gttttgcaag tttgaggtta  
 601 aagtccggag ctcaactccg gttcgccttg aaaactgtat tactagaatg caagagaggt  
 661 aagcgggaatt ccatgtgtag cggtgaaatg cgtagatata tggagaaca cctgtggcga  
 721 aagcggctta ctggcttggt attgacgctg aggcacgaaa gcgtggggag caaataggat  
 781 tagataccct agtagtccac gccgtaaacg atgagtacta agtgttgggg taactcagcg  
 841 ctgcagctaa cgcattaagt actccgcctg agtagtatgc tcgcaagagt gaaactcaaa  
 901 ggaattgacg gggaccgcga caagtgggtg agcatgtggt ttaattcgaa gcaa **cacgaa**  
 961 **gaaccttacc agggc**ttgac atccagtgc aagctataga gatatagtag aggttaacat  
 1021 tgagacaggt ggtgcatggt tgtcgtcagt tcgtgccgtg aggtgttggg ttaagtcccg  
 1081 caacgaacgc aacccttgtc gttagtact aacattaagt tgagaactct aacgagactg  
 1141 ctagtgaag ctagaggaag gtgggatga cgtcaaatca tcatgccct tatgtcctgg  
 1201 gctacacacg tgctacaatg gctggtacaa agagttgcaa tcctgtgaag gggagcta  
 1261 ctcaaaaaac cagtctcagt tcgattgaa gtctgcaact cgacttcacg aagccggaat  
 1321 cactagtaat cgcaatcag ctatgtcgcg gtgaatacgt tctcgggtct tgtacacacc  
 1381 gcccgtcaca ccatgagagt tggtaatacc agaagtaggt agcttaaccg tttggagagc  
 1441 gcttcccaag gtaggactag cgattggggg gaagtcgtaa caaggtatcc gtacgggaac  
 1501 gtgcggatgg atcacctcct ttct

>gi|127763381:c88427-86901 *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC str.

PG1 chromosome, complete genome

1 taaaat **gaga gtttgatcct ggctcagg**at aaacgctggc ggcacgccta atacatgcaa  
 61 gtcgaacgga ggtgcttgca cctcagtggc gaacgggtga gtaacacgta tctaacctac  
 121 ctcatagcgg gggataactt ttgaaacga aagataatac cgcatgtaga tcttattatc  
 181 gcatgagaaa agatcaaaag aaccgtttgg ttcactatga gatggggatg cggcgtatta  
 241 gctagtaggt gagataatag cccacctagg cgatgatacg tagccgaact gagaggttga  
 301 tcggccacat tgggactgag atacggcca gactcctacg ggaggcagca gtagggaatt  
 361 tttcacaatg gacgaaagtc tgatgaagca atgccgcgtg agtgatgacg gccttcgggt  
 421 tgtaaatctc tgttgtaagg gaagaaaaaa taaagtagga aatgacttta tcttgacagt  
 481 accttaccag aaagccacgg ctaactatgt gccagcagcc gcggtaatat atagggtggca  
 541 agcgttatcc ggatttattg ggcgtatagg gtgcgtaggc ggttttgcaa gtttgagggt  
 601 aaagtccgga gctcaactcc ggttcgcctt gaaaactgta ttactagaat gcaagagag  
 661 taagcggaat tccatgtgta gcggtgaaat gcgtagatat atggaagaac acctgtggcg  
 721 aaagcggctt actggcttgt tattgacgct gaggcacgaa agcgtgggga gcaaatagga  
 781 ttagataccc tagtagtcca cgccgtaaac gatgagtact aagtgttggg gaaactcagc  
 841 gctgcagcta acgcattaag tactccgcct gagtagtatg ctcgcaagag tgaaactcaa  
 901 aggaattgac ggggaccgcg acaagtgggt gagcatgtgg ttaattcga agcaa **cacga**  
 961 **agaaccttac caggc**ttga catccagtgc aaagctatag agatatagta gaggttaaca

```

1021 ttgagacagg tggatgcatgg ttgtcgtcag ttcgtgccgt aagggtgttg gttaagtccc
1081 gcaacgaaacg caacccttgt cgctagttac taacattaag ttgagaactc taacgagact
1141 gctagtgtaa gctagaggaa ggtggggatg acgtcaaadc atcatgcccc ttatgtcctg
1201 ggctacacac gtgctacaat ggctggtaca aagagttgca atcctgtgaa ggggagctaa
1261 tctcaaaaaa accagtctca gttcggattg aagtctgcaa ctcgacttca tgaagccgga
1321 atcactagta atcgcgaatc agctatgtcg cggatgaatac gttctcgggt cttgtacaca
1381 ccgcccgtca caccatgaga gttggtataa ccagaagtag gtagcttaac catttggaga
1441 gcgcttccca aggtaggact agcgattggg gtgaagtcgt aacaaggtat ccgtacggga
1501 acgtgcggat ggatcacctc ctttcta

```

Posteriormente se alinearon las secuencias de las especies del grupo mycoides, con el programa Multiple Sequence Comparison by Log- Expectation (MUSCLE) de European Molecular Biology Laboratory, European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), donde se pudieron determinar las secuencias constantes y variables de los genes para ubicar los iniciadores en las secuencias conservadas, ya que el producto de PCR identifica a las especies del grupo *Mycoides*.

Después, las secuencias, se analizaron con el programa Restriction Mapper Output, para realizar un mapeo de restricción con cada una de las secuencias, para obtener una mejor tipificación del grupo mycoides con aquella enzima que permitiera diferenciar a *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC, especie que es importante descartar en nuestros aislados y al realizar el ensayo virtual como lo muestra el cuadro 4.4 se observa que la enzima de restricción AluI obtenida de *Arthrobacter luteus* funciona para diferenciar ya que realiza tres cortes en SC y cuatro en *Mm* subsp. *capri*.

**Cuadro 4.4 Ensayo virtual con AluI**

Especie	Enzima	Secuencia	Frecuencia	Posición de Corte
<i>Mmmc</i>	<a href="#">AluI</a>	AGCT	43	235, 605, 235
<i>Mmm</i> SC	<a href="#">AluI</a>	AGCT	32	, 421, 605

### ***Mycoplasma spp:***

Después de realizar los protocolos de la PCR para *M. bovis*, *M. dispar* y *Mycoplasma* del grupo *mycoides*, no fue posible identificar algunos aislados así que para corroborar si pertenecían al género *Mycoplasma* spp., se trabajó con una PCR previamente estandarizada, empleando los iniciadores descritos por L´Abee-Lund *et al.*, 2001 para la secuencia del gen RNAr 16S de *Mycoplasma* spp, ya que se tenían previamente diseñados y obtenidos por . Esta secuencia fue analizada también con el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST®) del National Center for Biotechnology Information (NCBI), para verificar la especificidad de los iniciadores, su homología, cobertura e identidad entre especies de micoplasmas.

>gi|13445780|gb|AF340023.1| *Mycoplasma* sp 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

```
1 acgctggctg tgtgcctaat acatgc atgt cgagcggagt tcttcggaac ttagcggcga
61 atgggtgagt aacacgtact taacatgcct ttagattgg gacaacgatg agaaattatc
121 gctaataaccg gatacttata tggttcgc at gaactatata taaaagaagc ctttaaagct
181 tcactaaaag attgggggtgc ggaacattag ct agttggta aggtaatggc ttaccaaggc
241 gatgatgttt agcgggggtg agagactgat ccgccacact gggactgaga tacggcccag
301 actcctacgg gaggcagcag tagggaat t tccacaatgg acgaaagtct gatggagcga
361 cacagcgtgc aggatgaagg ccttcgggtt gtaaactgct gttataaggg aagaaaaagc
421 agtagaggaa atgctattgc cttgacggta ccttgtcaga aagcaacggc taactatgtg
481 ccagcagccg cggtaataca taggttgcaa gcgttatccg gaattattgg gcgtaaagcg
541 tctgtaggtt gtatgttaag tctggcgtga aaacttgggg ctcaaccca aattgcggtg
601 gatactggca tgctagaatt gtgtagaggt tagcggaaatt cctagtgaag cggtgaaatg
661 cgtagatatt aggaagaaca tcaacatggc gaaggcagct aactgggcac atattgacac
721 tgagagacga aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc acgctgtaaa
781 cgatgatgat tagctgatag taraactatc ggcacagcta acgattaaa tcatccgcct
841 gagtagtatg ctcgcaagag tgaacttaa aggaattgac ggggatccgc acaagcgggtg
901 gagcatgtgg tttaatttga agatackogt agaaccttac cactcttga catcttccgc
961 aaagctatag agatatagtg gaggctaacg gaatgacaga tgggtgatgg ttgtcgtcag
1021 ctcgtgtcgt gagatgttgc gtttaagtct gcaacgagcg caacccttgt ccttagttaa
1081 ttttctaggg agactgcccg agtaattggg aggaagggtg ggacgacgtc aaatcatcat
1141 gcctcttacg agtggggcaa cacacgtgct acaatggatg gtacaaagag aagcaaaagc
1201 gcgacgtcaa gcaaatctca aaaaaccatt ctcagttcgg attgtagtct gcaactcgac
1261 tacatgaagt cggaatcgct agtaatcgta gatcagctac gctacgggtg atacgttctc
```

1321 gggctcttgta cacaccgccc gtcacaccat ggagctggt aatgcccga gtcgggttttg  
 1381 ttaactacgg agacaactgc ctaaggcagg gccggtgact ggggtgaagt cgtaacaagg  
 1441 taaca

**Cuadro 4.5 Análisis de productos PCR BLAST de NCBI.**

Producto Amplificado	Descripción	% Identidad	% Cobertura
<b>M. bovis</b>	<i>Mycoplasma bovis</i> PG 45 MU	100	100
	<i>Mycoplasma bovis</i> Gen Oligopeptido permeasa D y F	100	100
	<i>Mycoplasma bovis</i> Hubei-1	100	100
	<i>Mycoplasma agalactiae</i> 5632	86	99
	<i>Mycoplasma agalactiae</i> PG2	86	99
<b>M. dispar</b>	<i>Mycoplasma dispar</i> ATCC 27140 16 S polimerasa	100	100
	<i>Mycoplasma flocculare</i> Ms 42 16 S polimerasa	96	96
	<i>Mycoplasma conjunctivae</i> HRC	92	93
	<i>Mycoplasma conjunctivae</i> HRC 16 S polimerasa	92	93
	<i>Mycoplasma conjunctivae</i> Goat 655 16 S polimerasa	95	75
<b>M. grupo mycoides</b>	<i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC str. Gladysdale SC	100	100
	<i>Mycoplasma mycoides</i> PG1	100	100
	<i>Mycoplasma mycoides capri</i> LC 95010	99	100
	<i>Mycoplasma mycoides</i> LC 16 S ribosomal genoma completo	99	100
	<i>Mycoplasma mycoides</i> LC16 S polimerasa	99	100
<b>Mycoplasma spp.</b>	<i>Mycoplasma canis</i> 16S ribosomal RNA secuencia parcial	99	100
	<i>Mycoplasma edwardii</i> 16S ribosomal RNA	99	100
	<i>Mycoplasma cynos</i> strain H831 16S ribosomal RNA secuencia parcial	98	100
	<i>Mycoplasma bovirhinis</i> gene for 16S rRNA	97	100
	<i>Mycoplasma</i> sp. 16 ribosomal secuencia parcial	96	100
	<i>Mycoplasma bovis</i> PG45 genoma completo	91	100

#### 4.7.2 Estandarización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la estandarización de las reacciones de la PCR y como controles fueron utilizadas las cepas tipo de *Mycoplasma dispar* cepa 462/2<sup>8</sup>, *Mycoplasma bovis* cepa Donnet<sup>9</sup>, *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*, cepa tipificada molecularmente previamente en el laboratorio de Micoplasmas de la FMVZ-UNAM.

Los reactivos se utilizaron con las mismas concentraciones para las diferentes reacciones, los DNTP'S 10 mM (micromolar), Buffer 10 X, Cloruro de Magnesio<sup>15</sup> 50 mM, la TAQ polimerasa<sup>16</sup> se utilizó en una concentración de 500 UI (Unidades Internacionales) y los iniciadores<sup>17</sup> 20 picomolar. El ADN de las cepas control fue

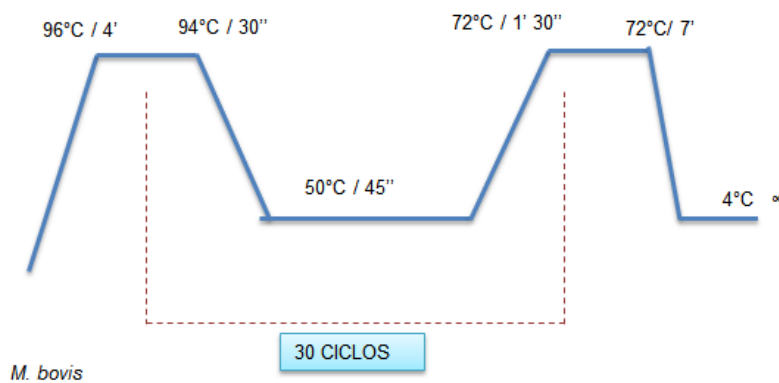
<sup>8</sup> Donada por la Universidad de Aarhus Dinamarca

<sup>9</sup> Donada por la Universidad de Aarhus Dinamarca

cuantificado con el NanoDrop, que arrojó las siguientes lecturas promedio: *M. bovis* 207.3 ng/  $\mu$ l, *M. dispar* 181.0 ng/  $\mu$ l, *M. mycoides* subsp. *capri* 714.6 ng/  $\mu$ l.

### ***Mycoplasma bovis***

La PCR de la cepa tipo de *Mycoplasma bovis* se realizó con el protocolo establecido por Hotzel 1999, con algunas modificaciones para la optimización en la temperatura de alineación. Para determinar la especificidad de la reacción se utilizó, la cepa tipo de *M. dispar* y *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. Se realizó un gel de agarosa<sup>10</sup> al 1.5% en 50 ml de TAE 1X (Tris Ácido Acético EDTA), los productos se cargaron junto con el buffer de carga 0,2 % de Azul de Bromofenol y 0,2% de Xyleno-Cianol y se utilizó el marcador de peso molecular 1 kb plus, se corrió a 80V por 40 minutos, teñido con bromuro de etidio



**Figura 4.7.2.1 Condiciones de la PCR para *M. bovis*.**

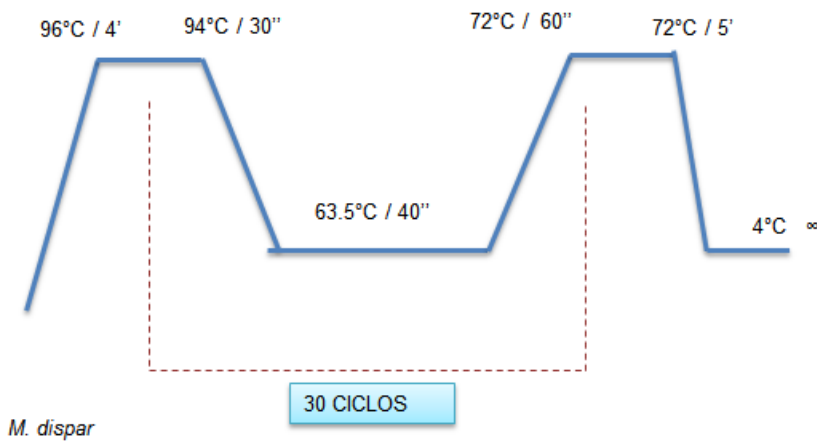
Una vez estandarizada la PCR, se realizaron diluciones del ADN que inicialmente se encontraba en 207.3 ng/ $\mu$ l y para poder observar la sensibilidad de la PCR con la cantidad mínima de ADN, de la extracción de ADN se realizaron 6 diluciones dobles seriadas en un volumen final de 50  $\mu$ l. Las concentraciones de ADN que quedaron en las diluciones fueron: 103 ng/  $\mu$ l, 52.3 ng/  $\mu$ l, 26 ng/  $\mu$ l, 13 ng/  $\mu$ l, 6.5 ng/  $\mu$ l y 2 ng/ $\mu$ l.

<sup>10</sup>PROMEGA



### ***Mycoplasma dispar***

Para *M. dispar* se estandarizó la PCR realizando un primer ensayo con temperaturas de alineación en gradiente señalado en el programa Oligoanalyzer 3 de Integrated DNA technologies (IDT), que fue 59.1°C y la del proveedor de los iniciadores INVITROGEN 68 °C por lo que se tomó el gradiente desde 60 a 65.1°C. El amplicón que se observó mejor definido y más limpio fue el de la temperatura de 63.1°C, la que se tomó para la PCR. Para determinar la especificidad de la reacción se utilizaron las cepas tipo de *M. bovis* y *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*.



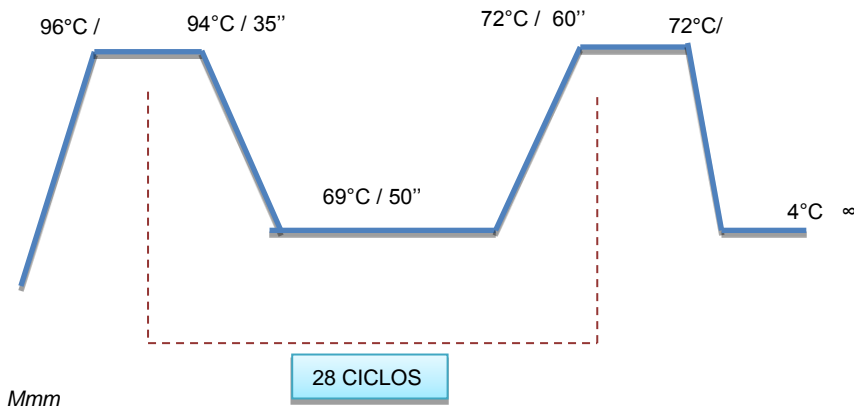
**Figura 4.7.2.2 Condiciones de la PCR para *M. dispar***

Para determinar la sensibilidad de la prueba se realizaron diluciones de la concentración inicial de 187 ng/μl, por lo que se prepararon 8 diluciones dobles seriadas en un volumen final de 50 μl para determinar la cantidad mínima de ADN detectada en la PCR, con las siguientes cantidades 150 ng/ μl, 72 ng/ μl, 46 ng/ μl, 17 ng/ μl, 9 ng/ μl, 4.5ng/μl, 1.1 ng/μl.

### ***Mycoplasma mycoides***

Para *M. mycoides* se estandarizó con una PCR de gradiente con las temperaturas de alineación de los iniciadores, para ello fue tomada en cuenta la que arrojó el resultado del programa Oligoanalyzer 3 de IDT, que fue de 73 °C y la del proveedor de los iniciadores IBT(Instituto de Biotecnología- UNAM) 68.1 °C, por lo que se realizó un gradiente de 58 hasta 70°C, que amplificó el tamaño esperado de 970

pb, por lo que se seleccionó la temperatura más alta y ya, que los iniciadores codifican para una secuencia muy conservada del gen RNAr 16S, se usaron como controles de especificidad a *M. bovis* y *M. dispar*.



**Figura 4.7.2.3 Condiciones de la PCR para *Mmmc***

Una vez comprobado que las condiciones de la PCR solo amplificaban para el grupo *Mycooides*, se realizó el ensayo con la enzima de restricción Alu I, el cual consistió en realizar una reacción que se muestra en el cuadro 4.6.

**Cuadro 4.6 Condiciones para la Reacción con la enzima de restricción ALU I**

REACTIVOS	CANTIDAD
Buffer 10 x	2 µl
Alu I	1 µl
Producto ADN ≤ 1 µg	10 µl
Agua estéril	7 µl

El producto de la reacción de PCR a analizar se incubó a 37°C por 1 h en baño de recirculación, temperatura de activación de la enzima, después se incubó 65 °C 20 minutos para la inactivación de la enzima. Los productos de la digestión se visualizaron en geles de agarosa al 2% en 50 ml de TAE 1X (Tris Ácido Acético EDTA), se utilizó el marcador de peso molecular Trackit™ 50 Pb, el gel se corrió a 75 V durante 120 min, teñido con bromuro de etidio.

### ***Mycoplasma* spp.**

La PCR para la identificación de *Mycoplasma* spp., se realizó de acuerdo al siguiente protocolo: mostrado en la :

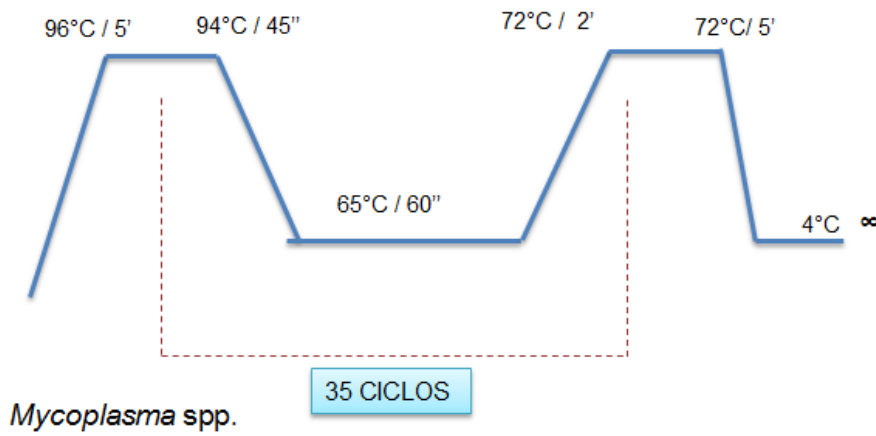


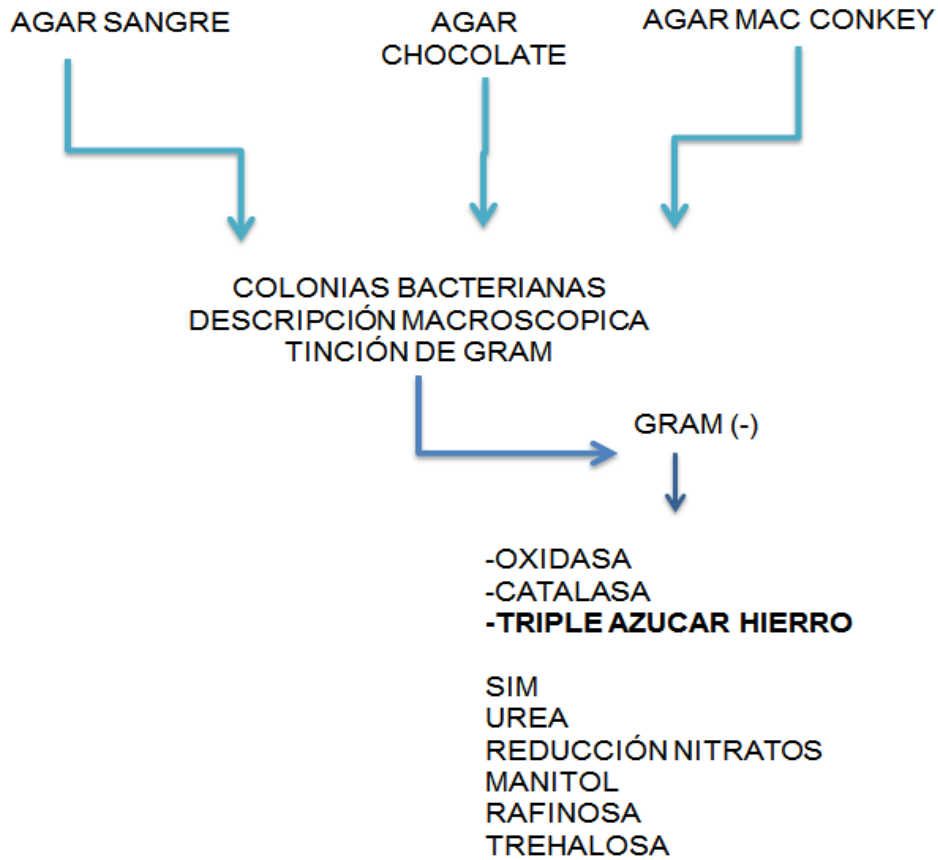
Figura 4.7.2.4 Condiciones de la PCR para *Mycoplasma* spp.

### **4.8 ANALISIS BACTERIOLÓGICO**

Los hisopos nasales de bovinos fueron transportados en el medio Stuart a temperatura de refrigeración hasta su procesamiento en el laboratorio. El aislamiento bacteriológico fue realizado según la metodologías de Birberstein E. y Yuan Chung 1994, así como Barrow GI y Feltham RK, 1993. Las muestras se sembraron en placas con medio de Agar Chocolate para favorecer el aislamiento y desarrollo de *Histophilus somni*, al tiempo también se sembraron en agar sangre y agar Mac Conkey, éstas se incubaron a 37°C en aerobiosis; mientras que las placas de agar chocolate se incubaron a 37°C en microaerobiosis, luego de 24 a 48 h se observaron las placas para el análisis y separación de colonias bacterianas de interés, orientado a la búsqueda de *Pasteurella* sp., *Mannheimia* sp, e *Histophilus somni*; se realizó la tinción Gram para identificar bacterias Gram negativas, a las cuales se les realizó la prueba de oxidasa y catalasa para así poder inocular al aislado en el medio TSI (triple azúcar hierro), el cual fue incubado 37°C de 18 a 24 h tal como lo señala el cuadro 4.8. Solo las reacciones que resultaron con acidificación del medio en la superficie y en el fondo presentando una coloración amarilla, se tomaron en cuenta para inocular las pruebas

complementarias y así llevar a cabo la identificación los géneros referidos asociados a problemas respiratorios en bovinos.

**Cuadro 4.8 Diagrama proceso identificación bacteriológica.**



#### 4.9 ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados de esta investigación se analizaron con el Programa EPIDAT 4.0<sup>11</sup> para evaluar la concordancia entre la Identificación bioquímica y la tipificación molecular con la PCR, calculando el valor de Kappa de Cohen según el cuadro de Landis y Koch. Epidat 3.1., Para la correlación entre la presencia de micoplasmas y enfermedad en los bovinos muestreados se utilizó el programa estadístico SPSS 20 (Bernad Rosner, 2000), con la prueba No paramétrica de Sperman, misma prueba que se utilizará para la correlación de *Mycoplasma* y la presencia de bacterias asociadas.

---

<sup>11</sup> Programa EPIDAT 3.1 Organización panamericana de la salud.

## 5.0 RESULTADOS

### 5.1 Aislamientos de *Mollicutes*

Con respecto a 374 muestras totales analizadas se detectó en 132 de ellas la presencia del microorganismo de la clase *Mollicutes*.

De las 132 positivas a *Mollicutes*, 122 correspondieron al género *Mycoplasma* y 12 al género *Acholeplasma*. En tanto que, en dos de las muestras se observó la mezcla de ambos géneros.

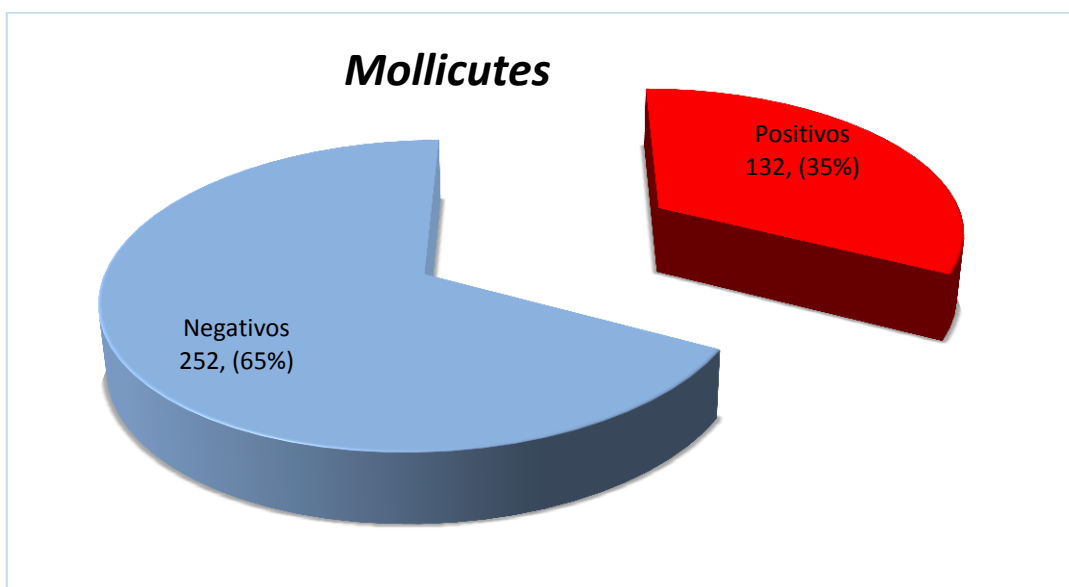


Gráfico 5.1 *Mollicutes* aislados del total de muestras de bovinos con problemas respiratorios

#### 5.1.1 Aislamiento de *Mycoplasma* en los diferentes grupos de estudio

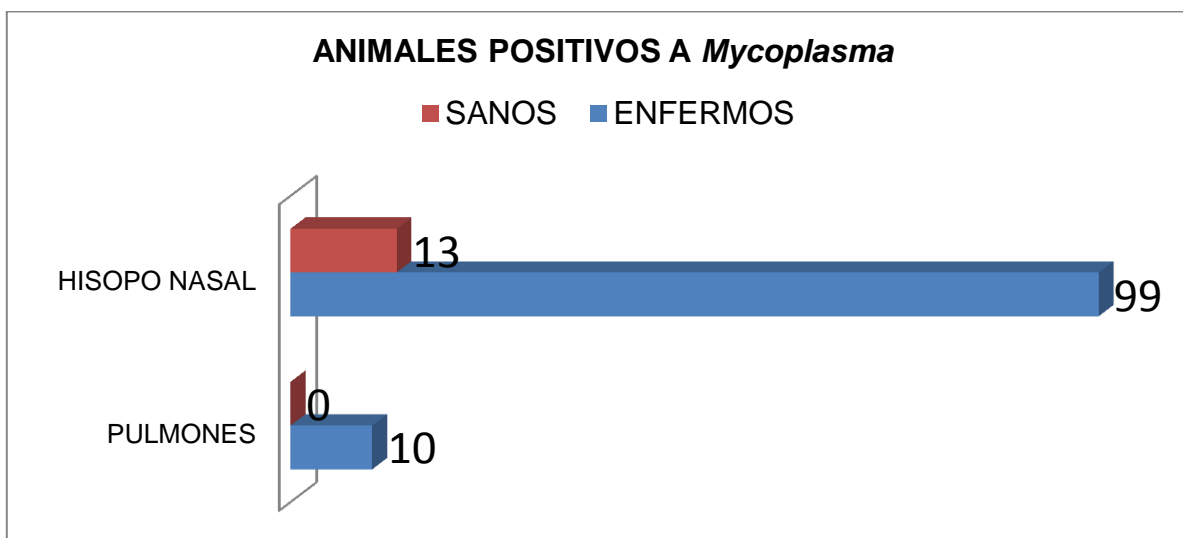
De 374 muestras se encontró un mayor porcentaje de animales positivos en la zona de Hidalgo en muestras de hisopo nasal.

**Cuadro 5.1 Muestras positivas a *Mycoplasma* spp., en los diferentes grupos de estudio.**

MUESTRAS	TOTAL	<i>Mycoplasma</i> (+)	% de positivos	<i>Mycoplasma</i> (-)	% de negativos
pulmón de rastro	50	0	0	50	100
Pulmón de Hidalgo	14	10	71.4	4	29.6
Hisopo nasal Hidalgo	191	73	38.2	118	61.8
Hisopo nasal Durango - Torreón	119	39	32.77	80	67.2
TOTALES	374	122	33	252	67

### 5.1.2 Correlación de la presencia de *Mycoplasmas* y la presencia de signología clínica en los hatos en estudio

De las 122 muestras positivas al aislamiento de *Mycoplasma* spp., procedentes de hatos de animales con problemas respiratorios, 109 presentaban signología respiratoria, como: secreción nasal, tos, neumonía, epifora y baja condición corporal por neumonía crónica, de éstas 99 fueron de hisopados nasales y las 10 restantes de pulmón, grafico 5.1.2.,



**Grafico 5.1.2. Correlación de animales positivos a *Mycoplasma* y la presencia de signología clínica respiratoria.**

Con los resultados se realizó la prueba No paramétrica de Spermán, utilizando el programa IBM SPSS 20 para correlacionar el estado clínico y la presencia de

*Mycoplasma* spp. El valor calculado de la significancia de correlación entre las variables fue de 0.000. Siendo este menor al valor crítico de  $P < 0.05$  (alfa de 5%) con un intervalo de confianza del 95 %, se determinó que, si existió correlación entre la signología respiratoria y la presencia de micoplasmas. El estudio arrojó un valor calculado de Rho (0.461), señalando un nivel de correlación moderada entre las variables, Cuadro 5.1.2.2

**Cuadro 5.1.2.2 Análisis estadístico de la presencia de micoplasma y signología respiratoria.**

			Positivos <i>Mycoplasma</i>	aSignología Respiratoria
Rho de Spearman	Coeficiente de correlación	de	1.000	.461*
	Positivos <i>Mycoplasma</i>	<b>Sig. (bilateral)</b>	.	<b>.000</b>
	N		374	372
	Coeficiente de correlación	de	.461*	1.000
Signología Respiratoria	Sig. (bilateral)		.000	
	N		372	372

\*\* . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

### 5.1.3 Tipificación bioquímica de las diferentes especies de *Mycoplasmas*.

De las 122 muestras positivas a micoplasmas, en realidad se recuperaron 141 aislados, debido a que en algunos de los cultivos primarios estaban presentes especies diferentes, determinado ello por la morfología colonial. En el cuadro 5.1.3, se muestran las especies identificadas bioquímicamente de mayor a menor porcentaje. De las especies que se asilaron en abundante cantidad fueron *M. bovis*, *M. dispar* y *Mycoplasma* del grupo *mycoides*, estas especies son fuertemente relacionadas a problemas respiratorios en bovinos.



**Cuadro 5.1.3 Especies de *Mycoplasmas* identificadas por medio de pruebas bioquímicas.**

TIPIFICACIÓN BIOQUIMICA		
ESPECIES	AISLADOS	%
<i>M. bovis</i>	54	38.3
<i>M. dispar</i>	36	25.5
<i>M. mycoides</i>	17	12
<i>Mycoplasma</i> spp.	10	7.05
<i>M. californicum</i>	8	5.67
<i>M. arginini</i>	2	1.4
<i>M. bovisgenitalium</i>	1	0.79
<i>M. alkalecescens</i>	1	0.79
<i>Acholeplasma</i>	12	8.5
TOTAL	141	100

## 5.2 Optimización de las técnicas moleculares

En general se optimizó y estandarizaron las técnicas moleculares como se indicó en material y métodos con ensayos de PCR con gradiente de temperatura de alineación. Posteriormente para cada especie se determinó la concentración mínima de ADN capaz de ser detectada por la PCR.

### 5.2.1 *Mycoplasma bovis*

Para la PCR de *Mycoplasma bovis* se optimizó con el protocolo de Hotzel 1999, para obtener el producto de 1.9 Kb, con una temperatura de alineación de 50° C. La dilución donde se observó una mejor amplificación fue la que contenía 13 ng/μl, como se muestra en la figura 5.2.1

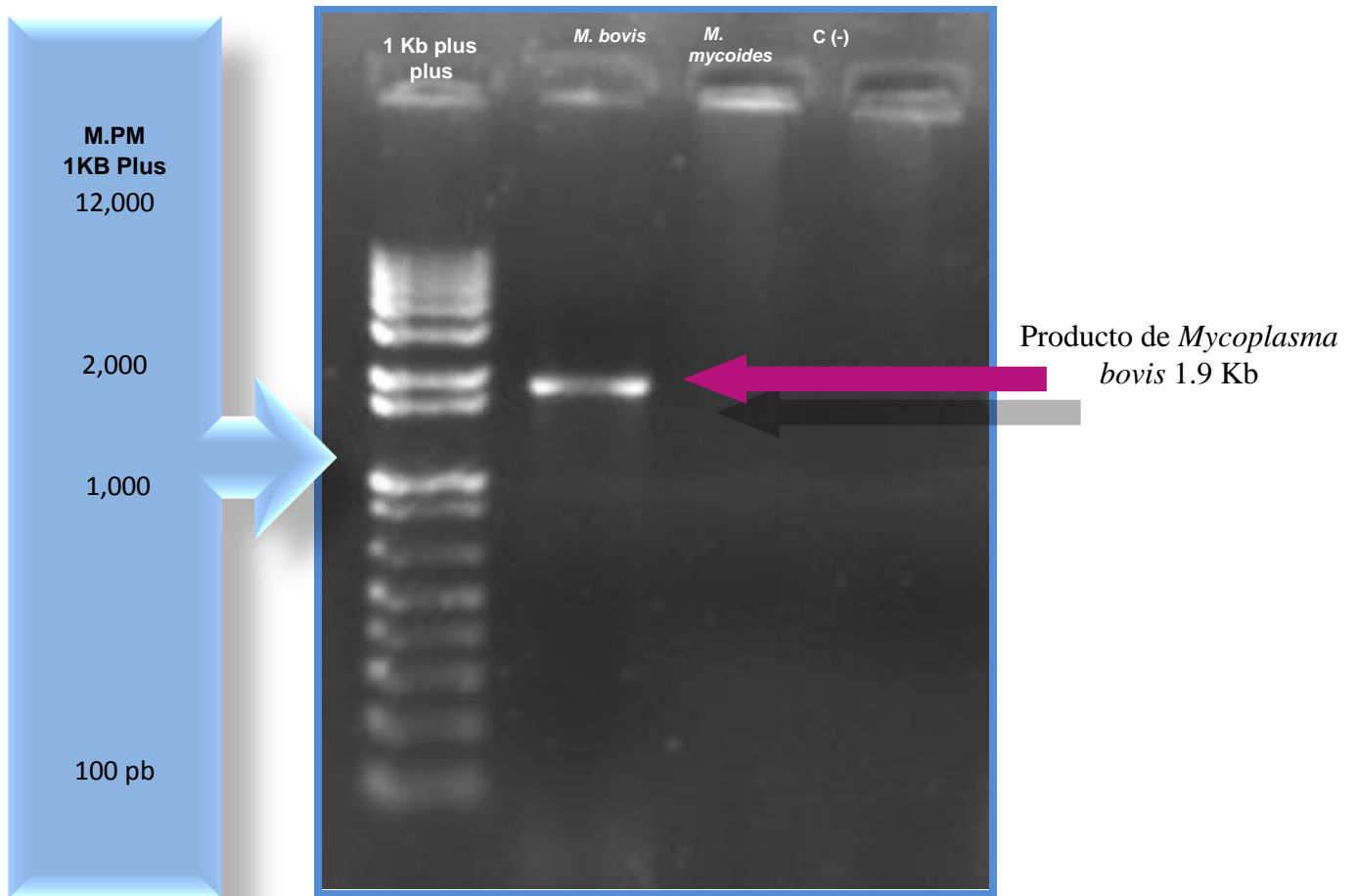


Figura 5.2.1 Gel de agarosa 1 %, Producto de la PCR *Mycoplasma bovis* cepa donneta.

Finalmente al realizar la PCR para los 141 aislados se identificaron a 56 como *M. bovis* ya que mostraron el amplicón esperado.

### 5.2.2. *Mycoplasma dispar*

La PCR de *M. dispar* se estandarizó con una temperatura de alineación de 63.1°C como se muestra en la figura 5.2.2.1, la concentración de ADN adecuada fue de 9 ng/ µl para amplificar el producto de 548 pb. Como se observa en la Figura 5.2 donde se observa una mayor fidelidad del producto. Se analizaron los mismos 141 aislados de *Mycoplasma* spp., donde se observaron finalmente a 35 aislados que amplificaron el fragmento de *M. dispar*.

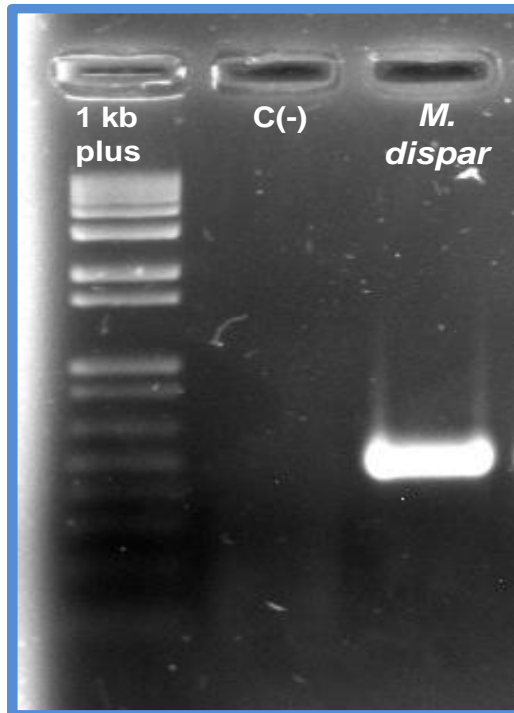


Figura 5.2.2.1 Gel de agarosa 1.5 %, producto de la PCR de *Mycoplasma dispar*

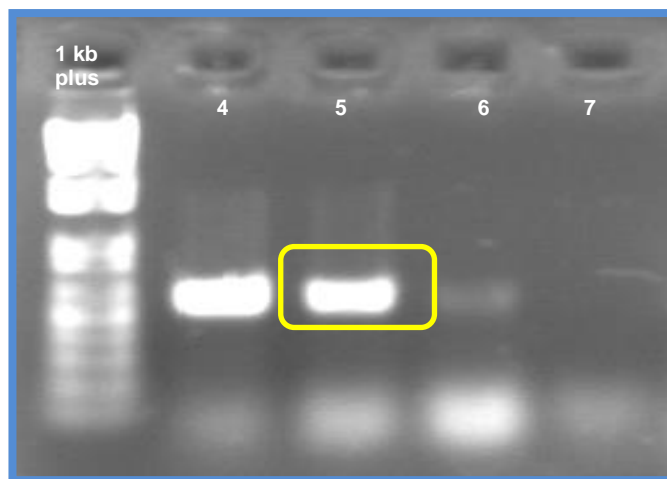


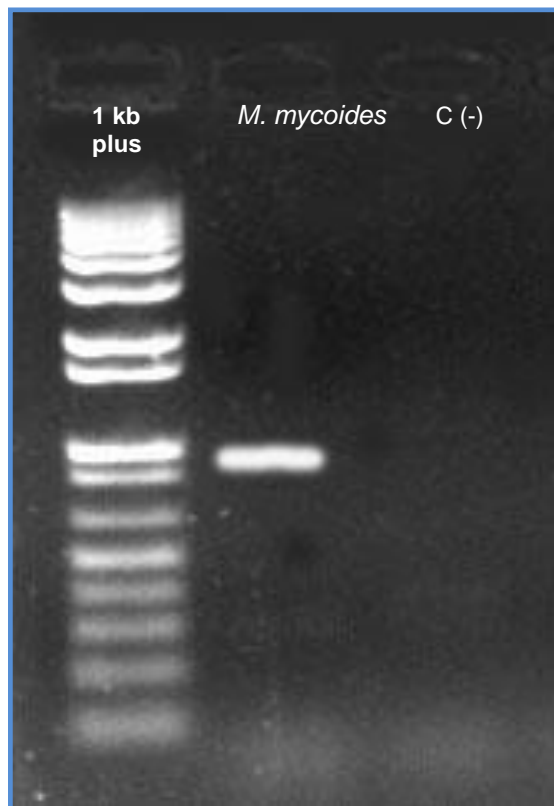
Figura 5.2.2.3 Gel de agarosa 1.5 %, de la estandarización de la cantidad mínima de ADN detectable en la PCR para *M. dispar*, donde la dilución cinco (resaltada con recuadro amarillo), fue la más clara.

### 5.2.3 *Mycoplasma mycoides*

Para *M. mycoides subsp capri* primero se logró estandarizar realizando la PCR con temperatura de alineación de 69 °C, se utilizó una temperatura muy alta debido a que el gen con el que se trabajó en esta PCR es el del RNAr 16S,

secuencia conservada entre géneros bacterianos, el producto esperado fue de 970 pb, figura 5.2.3.1, la concentración mínima capaz de ser detectada, fue de 23 ng/ $\mu$ l, donde se logró observar claramente con las condiciones de estandarización de la PCR, como se muestra en la figura 5.2.3.2.

Una vez amplificado el producto de la PCR que identificó al grupo *Mycooides* se procedió a llevar a cabo la digestión con la enzima de restricción Alu I, observándose entonces los fragmentos esperado, para la especie *Mmmc* y cuatro fragmentos para *MmmSC*. figura 5.2.3.3. Finalmente al realizar la PCR y la digestión se obtuvieron 22 aislados identificados como *Mmmc*.



**Figura 5.2.3.1** Gel de agarosa 1%, Producto de la PCR para *Mmm capri*.

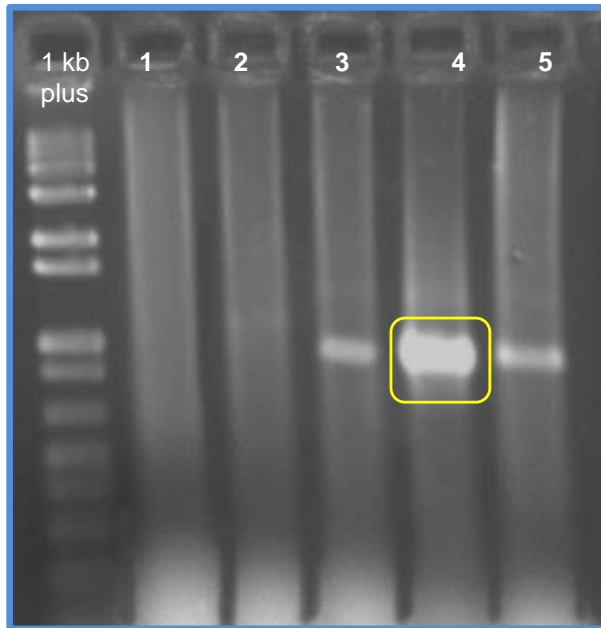


Figura 5.2.3.2 Estandarización de cantidad mínima de ADN detectable en la PCR para *Mmm capri*, donde la dilución cinco (resaltada con recuadro amarillo), es la que mejor se observó.



Figura 5.2.3.3 Digestión del producto de la PCR para el grupo *Mycoides*, carril 1 MPM, carril 2 pproducto de la PCR y carril 3, producto de la digestión con Alu I.

### 5.3. Resultados de las diferentes técnicas de PCR

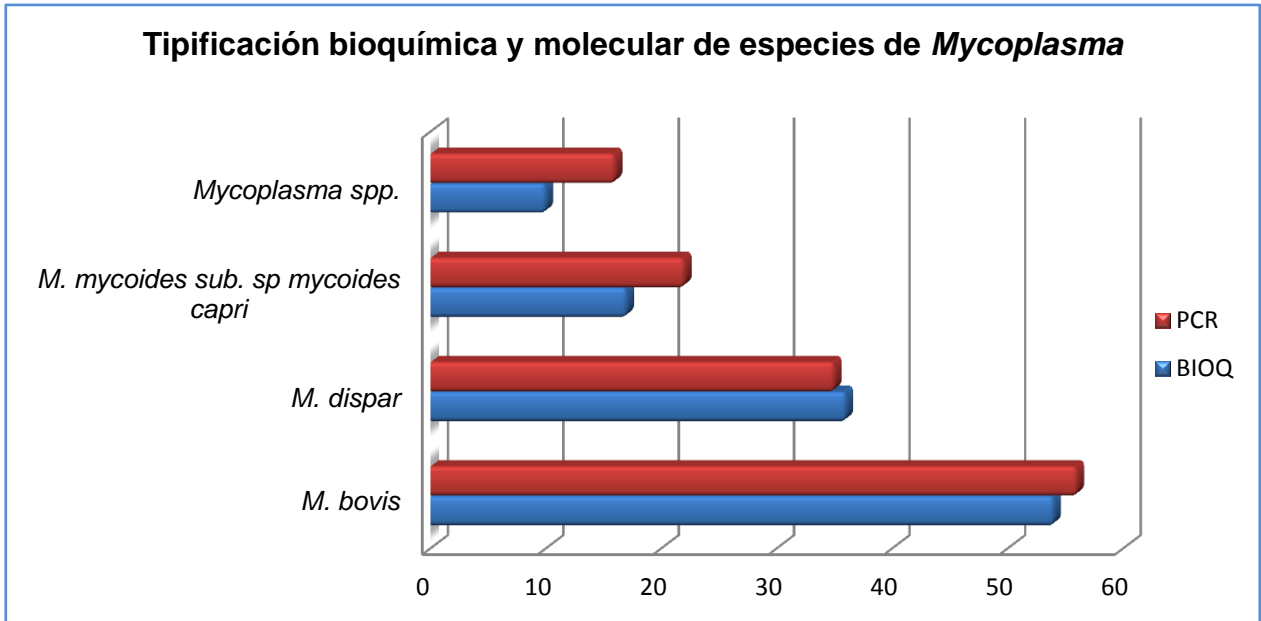
De los 141 aislados, después de realizar la PCR para las diferentes especies, se logró detectar a 56 como *M. bovis*, 35 como *M. dispar*, *Mycoplasma mycoides subsp. capri*. Finalmente para corroborar que los aislados restantes pertenecían al género *Mycoplasma* se obtuvieron 16 tipificados dentro de este grupo con los iniciadores de la RNAr 16S, los 12 restantes coincidieron con las pruebas realizadas con digitonina y filtrabilidad que identificados inicialmente como *Acholeplasma* spp.

Cuadro 5.3 Especies de *Mycoplasmas* identificadas por medio de PCR.

ESPECIES	PCR
<i>M. bovis</i>	56
<i>M. dispar</i>	35
<i>M. mycoides sub. mycoides capri</i>	22
<i>Mycoplasma</i> spp.	16
Aislados No Identificados	12
<b>TOTAL</b>	<b>141</b>

### 5.4 Resultados de la tipificación bioquímica y molecular

De los 141 aislados de *Mycoplasma* spp, el porcentaje que mostro la identificación bioquímica de *Mycoplasma bovis* fue de un 38.3 % (54), sin embargo con la PCR 39.7% (56), mostrando una diferencia entre las pruebas de aproximadamente 1 %, *M. dispar*, se identificó bioquímicamente en un total de 25.5 % (36), por la PCR 24.8 % (35), *Mmmc*, 12% (17) y 15.6 % (22) bioquímica y por PCR respectivamente. Finalmente para los aislados identificados como *Mycoplasma* sp, 11% (16), por medio de la PCR.



**Grafico 5.4 Identificación de *Mycoplasma* por medio de pruebas bioquímicas y Moleculares**

### 5.5 Concordancia entre las dos técnicas realizadas para la tipificación de especies de Micoplasmas.

Para examinar la concordancia de los resultados con las metodologías utilizadas se desarrolló una tabla de contingencia de 2 x 2 para obtener el valor de Kappa de Cohen mediante el programa de EPIDAT 3.1, con un nivel de confianza de 95%.

*M. bovis*

TIPIFICACIÓN BIOQUÍMICA	TIPIFICACIÓN MOLECULAR (PCR)		
	+	-	Total
+	50	4	54
-	6	81	87
Total	56	85	141

El valor de concordancia entre las pruebas fue de 0.85

Según el valor de Kappa, la concordancia entre ambas pruebas para identificar a *M. bovis* es muy buena.

*M. dispar*

El valor de concordancia entre las pruebas fue de 0.86

Los resultados que se observaron con el valor de kappa para *M. dispar* también fueron considerados muy buenos para identificar al microorganismo.

TIPIFICACIÓN BIOQUÍMICA	TIPIFICACIÓN MOLECULAR (PCR)			
		+	-	Total
+		32	4	36
-		3	102	105
Total		35	106	141

*Mmmc*

Valor de concordancia entre las pruebas fue de 0.39

Debido a que por medio de las pruebas bioquímicas no se puede diferenciar entre especies los resultados se mostraron totalmente diferidos, por tanto el valor de kappa de Cohen fue de bajo.

TIPIFICACIÓN BIOQUÍMICA	TIPIFICACIÓN MOLECULAR (PCR)			
		+	-	Total
+		9	8	17
-		12	112	124
Total		21	120	141

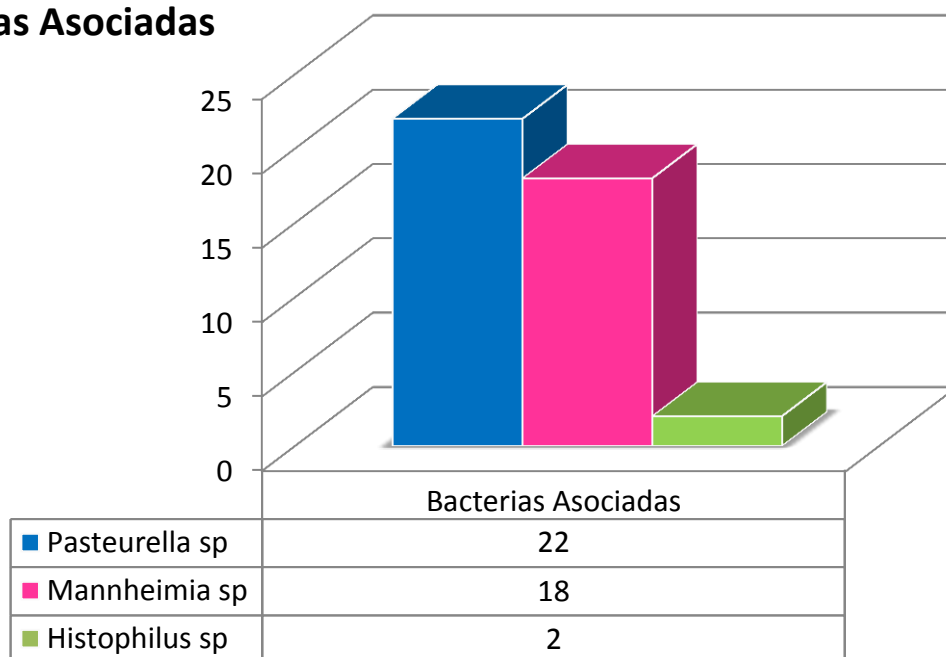
### 5.6 Aislamiento bacteriológico y la correlación con *Mycoplasma* sp.

De las 374 muestras procesadas se logró identificar a los géneros *Pasteurella* spp. 22 (5.8 %), *Mannheimia* spp. 18 (4.8 %) e *Histophilus* spp. 2 (0.5 %). Los aislados



se obtuvieron de animales enfermos y sanos no necesariamente fueron muestras positivas a especies de micoplasmas.

### Bacterias Asociadas



**Grafico 5.6 Bacterias aisladas que son asociadas a problemas respiratorios en bovinos.**

Para valorar los resultados de los aislamientos bacterianos se determinó el coeficiente de correlación entre las muestras positivas a micoplasmas y la presencia de bacterias, empleando el programa IBM SPSS 20, con la prueba No paramétrica de Sperman, que reveló la no correlación de los resultados entre muestras positivas al aislamiento de *Mycoplasma* y *Pasteurella*. Cuadro 5.6.1

**Cuadro 5.6.1 Correlaciones entre las muestras positivas a *Mycoplasma* spp y *Pasteurella* spp.**

			Positivos <i>Mycoplasma</i>	Positivos <i>Pasteurella</i>
Rho Spearman	de <i>Mycoplasma</i>	Coeficiente de correlación	1.000	.083
		<b>Sig. (bilateral)</b>	.	<b>.109</b>
		N	374	374
	de <i>Pasteurella</i>	Coeficiente de correlación	.083	1.000
		Sig. (bilateral)	.109	.
		N	374	374

El valor obtenido al aplicar la prueba fue de 0.109 que es mayor al valor de  $P < 0.05$ , la interpretación de este resultado mostró la No correlación entre la Presencia de *Mycoplasmas* spp., y los que resultaron positivos a *Pasteurella* spp.

Los resultados del análisis para correlacionar la presencia de micoplasmas y *Mannheimia* spp, fue de 0.350, que también es un valor mayor de  $P < 0.05$ , indicando la No correlación entre la presencia de micoplasmas y aquellos que resultaron positivos a *Mannheimia* spp., cuadro 5.6.2

**Cuadro 5.6.2 Correlaciones entre las muestras positivas a *Mycoplasma* spp y *Mannheimia*.**

			Positivos <i>Mycoplasma</i>	Positivos <i>Mannheimia</i>
rho Spearman	de <i>Mycoplasma</i>	Coeficiente de correlación	1.000	.048
		<b>Sig. (bilateral)</b>	.	<b>.350</b>
		N	374	374
	de <i>Mannheimia</i>	Coeficiente de correlación	.048	1.000
		Sig. (bilateral)	.350	.
		N	374	374

## 6.0 DISCUSIÓN

### 6.1 Identificación de *Mycoplasma* spp.

Las bacterias de la clase *Mollicutes*, se han asociado a problemas de neumonías en bovinos, principalmente *Mycoplasma bovis* y *Mycoplasma dispar* aunque no se descartan especies menos reportadas, como *M. bovirhinis*, *Mmm LC*, *Mmm SC*, etc., por lo que en este estudio se aislaron y tipificaron bioquímicamente especies de *Mycoplasma* spp., de muestras de animales provenientes de hatos con problemas respiratorios.

De las 374 muestras totales, se logró el aislamiento de 132 (35%), bacterias de la Clase *Mollicutes*, después de realizar las pruebas bioquímicas para la identificación de género se identificó a *Mycoplasma* spp., en 122 (32%) muestras y en 12 (8%) se identificó *Acholeplasma* spp., cabe mencionar que en dos muestras que fueron positivas a *Mycoplasma* spp., se encontró también al género *Acholeplasmas* spp. Es importante diferenciar los géneros bacterianos de la clase *Mollicutes* ya que *Acholeplasma* spp., está considerado como microorganismo apatógeno y contaminante del medio ambiente, mientras que *Mycoplasma* spp., es considerado como un importante patógeno en bovinos. Esto es confirmado al observar estudios donde se diferencian los aislados de *Mollicutes*, tal como lo menciona Hisore *et al.*, 2003 en Japón, señalan que en muestras de hisopo nasal provenientes de animales con problemas respiratorios se aisló a *Mycoplasma* spp., en un 27 % y *Acholeplasma* spp en 6 %.

Sin embargo se encuentran trabajos donde solo reportan el aislamiento de *Mollicutes* como Wiggins *et al.*, 2007, ellos mencionan que, de 432 muestras de hisopo nasal de terneras con problemas respiratorios, por medio de aislamiento 63 (15%) resultaron positivas al aislamiento y White *et al.*, 2010 en Francia observaron en muestras de hisopo nasal un 7,6 % de positivas a *Mollicutes*.

## **6.2 Correlación de la presencia de *Mycoplasmas* y la presencia de signología clínica en los hatos en estudio**

En este trabajo se realizó un muestreo de hatos con historial de problemas respiratorios, donde se colectaron muestras de hisopo nasal provenientes de animales que presentaron signología de problemas respiratorios y algunos animales sanos como control negativo, asimismo se tomaron muestras de pulmón de animales que murieron por neumonía y pulmones de animales de rastro aparentemente sanos. Analizando los resultados se observó que, de 122 muestras que resultaron positivas a la presencia de *Mycoplasma spp.*, 109 provenían de animales que presentaron alguna signología respiratoria, de los cuales 99 fueron muestreados con hisopados nasales y las 10 restantes de los pulmones de animales que murieron por neumonía, por lo que se realizó la correlación estadística con la prueba no paramétrica de Spermán, que mostró una correlación con nivel moderado entre la signología y la presencia de *Mycoplasma*. Resultados similares los mencionan Kusiluka *et al.*, 2000 en Dinamarca informaron la presencia del 86 % de *Mycoplasma spp.*, en muestras de pulmón de bovinos enfermos, al igual Hartel *et al.*, 2004 en Finlandia, muestran 93% de muestras positivas a *Mycoplasma spp.*, de lavado traqueo-bronquial de animales de hatos con problemas respiratorios. Fulton *et al.*, 2009 EUA, en muestras de pulmones de bovinos con signología respiratoria reportaron 71 % de aislados de *Mycoplasma spp.*, Gabinaitiene *et al.*, 2011 (a) en Lituania que reportan el aislamiento de *Mycoplasma spp.*, en 12 (34.3 %) de muestras de hisopo nasal de animales con signología clínica de problemas respiratorios y de 6 (17 %) pulmones como positivas a *Mycoplasma spp.*

## **6.3 Tipificación bioquímica de especies de *Mycoplasma spp***

Al realizar las diferentes pruebas bioquímicas a los 141 aislados de *Mycoplasma spp.*, se logró identificar a 54 (38%) *M. bovis*, 36 (25%) *M. dispar*, 17 (12%) *Mycoplasma* del grupo *mycoides*, 8 (5%) *M. californicum*, 2 (1%) *Mycoplasma arginini*, 1 (0.8%) *M. bovigentialium* y 1 (0.8%) *M. alkalecenscens*, finalmente 10 (7%) quedaron solo como género *Mycoplasma spp.*

Estos porcentajes coinciden con los resultados que mencionan Binder *et al.*, 1990, que reportaron en Alemania 36 % de aislamientos y tipificación bioquímica de *M. bovis* en muestras de hisopo nasal de animales con signología respiratoria e historia de neumonía, además, Thomas *et al.*, 2002, refieren en Bélgica que de 238 animales con problemas respiratorios el 78 % fueron positivos al aislamiento de *M. bovis*, 65 % en casos de neumonía aguda, 35 % de casos respiratorios recurrentes, 20 % de casos de exámenes post-mortem, aunque se menciona la correlación con otros microorganismos como *M. dispar* en 45.5 % de las muestras con problemas respiratorios recurrentes, igualmente Chazel *et al.*, 2010 en Francia reportaron los resultados del trabajo que se realizó con aislamientos de los años 2003-2008, provenientes de 23 laboratorios aprobados en el país, donde mencionan que el patógeno mayormente aislado fue *M. bovis* en un (55%) de un total de 1142, aunque también *M. bovirhinis* en un 27.5 %, *M. arginini* 14.1%, *M. mycoides* subsp *capri* 0.4 %. Finalmente Gabinaitiene *et al.*, 2011 (b) por medio de serología informaron de *M. bovis* en 75 % en animales de 110 días de edad y 55 % en animales de 310 días ambos grupos de hatos con problemas respiratorios. Aunque en algunos otros estudios mencionan a *M. dispar* y otras especies mayormente aisladas que *M. bovis* de problemas respiratorios en bovinos, como lo describen Kusiuka *et al.*, 2000 en Dinamarca, sus resultados muestran la identificación bioquímica de aislados provenientes de hisopos nasales a, *M. bovis* en un 24 %, *M. dispar* 48% y *M. bovigenitalium* 6 %, donde el organismo que más se aisló fue *M. dispar*, al igual que Hirose *et al.*, 2003 en muestras de Japón recolectadas de 1996 a 1997, encontraron a *M. bovirhinis* en el 16 % de las muestras de hisopo nasal, a *M. alkalescens* en 6.5 %, *M. bovis* y *M. arginini* en 2.4 %, *M. bovigenitalium* y *Acholeplasma* sp., en 1.4 %, finalmente Hartel *et al.*, 2004 reportaron 59 % de *M. dispar* en muestras de lavados bronquiales a *M. bovis* no lo identificaron.

Además se ha identificado a especies de micoplasmas realizando técnicas serológicas, un ejemplo de ello es el estudio de Muenster *et al.*, 1978, en Canadá por medio de inmunofluorescencia en muestras de pulmón identificaron muestras positivas a *M. dispar* 56 %, *M. bovis* 37 %, *M. arginini* 33 %, *M. bovirhinis* 23 % y

*Mycoplasma* spp, 1%, asimismo en el trabajo presentado por Farshid *et al.*, 2002, identificaron por medio de la inmunohistoquímica a *M. bovis* en 92 % de muestras de pulmón de animales enfermos.

Romero *et al.*, 2010 realizaron inmunodetección de *M. bovis* en 9 muestras de pulmón de animales con problemas crónicos de neumonía, en la zona sur de México, donde detectaron en 8/9 (88 %) muestras positivas a *M. bovis*.

Todos estos datos apoyan la propuesta de mostrar a *M. bovis* y *M. dispar*, como patógenos involucrados en problemas respiratorios en bovinos, por lo que el National Mastitis Council (NMC) desde 1999, publicó que *Mycoplasma* spp, es un patógeno primario en problemas mastitis bovina, hecho que antecede a nuestro objetivo de asociar el género *Mycoplasma* problemas en bovinos.

#### **6.4 Aislamiento bacteriológico y la correlación con *Mycoplasma* spp.**

Los bovinos destinados a la producción láctea son sometidos a un alto estrés durante la etapa de producción, el destete en las becerras, traslado etc., situaciones que los hace susceptibles a enfermedades, sobre todo en vías respiratorias que son ocasionadas por factores múltiples. Los agentes infecciosos que son asociados al Complejo Respiratorio Bovino, como las bacterias *Pasteurella multocida*, *Mannheimia* spp., e *Histophilus* spp

Por lo que en este trabajo se buscó la relación que podía observarse entre los animales que presentaron aislamientos de *Mycoplasma* spp., y las bacterias asociadas en el CRB. Los resultados de la bacteriología de las muestras mostraron a *Pasteurella* spp., 22 (5.8 %), *Mannheimia* spp., 18 (4.8 %) e *Histophilus* spp., 2 (0.5 %) en las muestras que fueron positivas a *Mycoplasma* spp. En el análisis estadístico de Sperman, no existió la correlación entre las muestras positivas a bacterias asociadas y *Mycoplasma* spp. Otros autores trabajan con las bacterias asociadas al CRB, aunque no han mostrado una correlación estadística de estos aislamientos, solo se menciona el porcentaje de muestras positivas tal como lo señala, Haines *et al.*, 2001 en Canadá, mencionaron que en bovinos con problemas respiratorios se aisló a *M. bovis* en 40 (82 %) donde en 7 muestras encontró a *H. somnus* en 7 y *M. haemolytica* en 11 y

los 3 microorganismos juntos solo en 1 muestra, números similares a los resultados de este trabajo, de igual forma Shahriar *et al.*, 2002, realizaron un estudio retrospectivo y prospectivo, con muestras que resultaron positivas a *M. bovis* en Canadá de los años 1995 a 1998, donde, de las muestras del año 1995, 44 de 48 (91 %) fueron positivas a *M. bovis* de animales con neumonía así mismo se encontró una co-infección con *H. somnus* en solo 15 animales, el estudio prospectivo de un total de 16 animales 15 fueron positivos a *M. bovis*, en estos solo en 8 identificaron a *M. arginini*, a 3 animales positivos a *M. bovirhinis*, donde dos fueron de los positivos a *M. bovis*, finalmente 5 animales positivos a *M. bovis* fueron positivos a *H. somnus*. También en Canadá Gagea *et al.*, 2006, reportaron muestras de pulmón de bovinos con problemas de bronconeumonía al 98 % como positivos al aislamiento de *M. bovis*, *M. arginini* 82 % y *M. bovirhinis* 4 %, *M. haemolytica* 35 %, *P. multocida* 20% e *H. somni* en 17 %, ellos no realizaron la asociación de los diferentes microorganismos encontrados, Fulton *et al.*, 2009, identificaron la co-infección de *Mycoplasma spp.*, en pulmones de animales con problemas respiratorios y la presencia de *M. haemolytica* y *P. multocida* en 25 y 24 % respectivamente, en EUA. Soehlen *et al.*, 2011, observaron que de 90 muestras de pulmones neumónicos en 28.9 % se aisló a *M. bovis*, estas muestras presentaron una asociación con *Pasteurella spp.*, en un 12.2 %. Gabinaitiene *et al.*, 2011 en Lituania, examinaron 35 muestras de cavidad nasal de bovinos con 3 meses de edad donde reportaron a *M. bovis* en 22.9 %, con 5.7 % de *P. multocida*, 12 meses después se volvieron a muestrear los animales y se logró identificar a 11.4 % de muestras positivas hacia *M. bovis* y a *P. multocida* y *M. haemolytica* en 5.7 y 2.9 % respectivamente. Soehlen *et al.*, 2012, describen la co-infección de *M. bovis* con bacterias del género *Pasteurella spp.*, en un 3 % en muestras de la bifurcación bronquial y directamente de lesiones en pulmón de animales enfermos en un 12 %. Aunque Thomas *et al.*, en 2002 de 238 animales con problemas respiratorios el 78 % fueron positivos al aislamiento de *M. bovis* y la asociación con *Pasteurella spp.*, fue en más del 50 % de las muestras positivas a *M. bovis*.

### **6.5 Identificación molecular de los aislados de *Mycoplasma* spp.**

Los resultados observados con los iniciadores diseñados, nos mostraron un número similar de aislados identificados como *M. bovis*, *M. dispar*, *Mmmc* y los aislados identificados por medio con el gen de la RNA 16Sr como *Mycoplasma* spp. Al realizar la identificación con la secuencia del gen que codifica para RNA 16Sr, se identificaron 129 aislados como *Mycoplasmas* spp., Desde 1984 Razin *et al.*, trabajaron con la diferenciación de *Mollicutes* por medio de los genes de las subunidades 16Sr y 23Sr, por medio del Southern blot, donde mencionan que la prueba es capaz de detectar 1 ng de ADN de micoplasma, aproximadamente equivalente lo contenido de ADN de  $10^5$  micoplasmas, mientras en este trabajo se detectó la cantidad mínima de amplificación, para *M. bovis* en 13 ng/ $\mu$ l, *M. dispar* 9 ng/ $\mu$ l y para *Mmmc* 23 ng/ $\mu$ l. En este trabajo se logró identificar por medio de pruebas moleculares a 56 aislados como *M. bovis*, *M. dispar* en 35 y para el grupo *Mycooides* 22, las 16 restantes resultaron identificados como *Mycoplasma* spp., por medio de la PCR del gen que codifica para la RNA 16Sr, dato corroborado con la identificación de género con la prueba de sensibilidad a la digitonina, con lo que se identificó exactamente los aislados de *Mycoplasma* spp., por ambas técnicas.

Estos resultados son similares a los que mencionan Marques *et al.*, 2007 que detectaron, en 301 muestras de hisopo nasal de bovino, un 52.05 % (76) a *Mollicutes* en animales con signología respiratoria, por medio de aislamiento y confirmando con la secuencia de RNA 16Sr por medio de la PCR. Igualmente por medio de la PCR detectaron, en 54 (34.84%) a *M. dispar* en animales enfermos con problemas respiratorios y 9 (6.16%) en animales sanos por medio de la PCR, Talkhan *et al.*, 2009 en Egipto, mencionaron 4/20 (20 %) de aislados positivos a *M. bovis* de hisopos nasales y 1 (5%) de *Acholeplasma* spp., y corroboraron con la PCR con iniciadores de la 16S rRNA a los 4 aislados como *M. bovis*.



## **6.6 Concordancia entre las metodologías de identificación. Bioquímica y molecular de los aislados de *Mycoplasma* spp..**

Con el análisis de concordancia entre las pruebas realizadas (identificación bioquímica y molecular por la PCR) mediante el valor de Kappa de Cohen, indicó que el grado de acuerdo entre las dos pruebas para la tipificación de *M. bovis* fue muy bueno con un valor de Kappa de 0.850, por lo que la PCR con los indicadores del gen *oppF* y *oppD*, nos dan una opción más rápida para la identificación de los aislados. Para *M. dispar* fue la misma situación el valor de Kappa fue de 0.860, muy bueno para la identificación. Sin embargo para *M. mycoides* el valor de kappa de Cohen fue bajo, de 0.39 debido a que por medio de las pruebas bioquímicas no se puede diferenciar entre las especies del grupo *mycoides* ya que presentan reacciones metabólicas idénticas y la PCR es específica para diferenciar a *Mycoplasma mycoides subsp. capri*, por lo que los resultados se mostraron totalmente diferentes para este grupo.

## REFERENCIAS

1. Olguin y Bernal A, "Complejo Respiratorio Bovino". Clínica de Bovinos I, Complejo Respiratorio Bovino 2007.
2. Trigo TFJ. "El complejo respiratorio infeccioso de los bovinos y ovinos" Ciencia Veterinaria 1997;4:1-37.
3. Quiroz MAM. Neumonía en Becerras. Facultad de medicina Veterinaria y zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. 08 Enero de 2012.
4. González GA, Comprendiendo la neumonía bovina producida por Mannheimia (Pasteurella) haemolytica. Virbac Enero 2007.
5. Pijoan PA, Aguilar RF, Moralez AFJ. "Caracterización de los procesos neumónicos en becerros lecheros de la región de Tijuana, Baja California, México". Vet. Mex. 1999 30 (2) 149-155.
6. Nicholas RAJ, Ayling RD. *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis, and control. Res Vet Sci 2003;74:105-112.
7. Nicholas R, Ayling R and McAuliffe L. *Mycoplasma Diseases of Ruminants*. CABI International. Oxfordshire UK. 2008.
8. Nocard E, Roux E, Le microbe de la peripneumonie, Ann. Ins Pateur 1898;12: 240-262.
9. Ter Laak EA, Noordergraaf JH, Dieltjes RP. Prevalence of mycoplasmas in the respiratory tracts of pneumonic calves. Zentralbl Veterinarmed B. 1992 ; 39 (8) :553-62.
10. Byrne WJ, McCormack R, Brice N, Egan J, Markey B, Ball HJ. Isolation of *Mycoplasma bovis* from bovine clinical samples in the Republic of Ireland. Vet Rec. 2001 17;148(11):331-3.
11. Le Grand D, Saras E, Blond D, Solsona M, Poumarat F. Assessment of PCR for routine identification of species of the *Mycoplasma mycoides* cluster in ruminants. Vet Res. 2004 Nov-Dec;35(6):635-49.
12. Nicholas RAJ, Wood E, Baker SE and Ayling RD. Mycoplasmas isolated from ruminants in Britain 1995-2000. Epidemiol Mol Gen 2001;5:116-120.
13. Tschopp R, Bonnemain P, Nicolet J, Burnens A. Epidemiological study of risk factors for *Mycoplasma bovis* infections in fattening calves German. Schweiz Arch Tierheilkd. 2001 Sep;143(9):461-7.

14. Gabinaitiene A, Siugzdaite J, Zilinskas H. Laboratory diagnosis of *Mycoplasma* infection in young cattle. *Pol J Vet Sci.* 2011;14(1):87-93.
15. Marques LM, Buzinhani M, Yamaguti M, Oliveira RC, Ferreira JB, Mettifogo E, Timenetsky J. Use of a polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma dispar* in the nasal mucus of calves. *J Vet Diagn Invest.* 2007 Jan;19(1):103-6.
16. Howard CJ, Gourlay RN and Collins J, Serological comparison and haemagglutinating activity of *Mycoplasma dispar*. *J. Hyg., Camb.* (1974), 73, 457.
17. Wight D, Hirsh, Zee YC. *Veterinary Microbiology.* 1<sup>st</sup> ed. USA: Blackwell Science 1999.
18. Rottem S. Interaction of mycoplasmas with host cells. *Physiol. Rev.* 2003;83:417-32.
19. Tully JG y Razin S Cloning and filtration techniques for *Mycoplasmas*. En: *Methods in mycoplasmaology.* Estados Unidos: Academic Press 1983;173–177.
20. Smith PF. *The biology of Mycoplasmas* Depaertament of Microbiology University of south Dakota Vermillion, Academic Press 1971.
21. Razin S, Yogev D, Yehudith N, *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas.* *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998; 62 (4): 1094-1156.
22. Dybvig K y LeRoy LV. *Molecular biology of Micoplasmas.* *Annu Rev Microbiol* 1996;50:25-27.
23. Cottew GS, Breard A, DaMassa AJ, Ernø H, Leach RH, Lefevre PC, Rodwell AW, Smith GR. Taxonomy of the *Mycoplasma mycoides* cluster. *Isr J Med Sci.* 1987 Jun;23(6):632-635.
24. Thiaucourt 2000 Thiaucourt F, Lorenzon S, David A, Breard A. Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster as shown by sequencing of a putative membrane protein gene. *Vet Microbiol.* 2000 Mar 15;72(3-4):251-68.
25. Nicholas RAJ (b). *Contagious Caprine Pleuropneumonia.* Departament of bacterial Diseases, The Veterinary Laboratories Agency, Addlestone, Surrey, UK.2002
26. Taylor TK, Bashiruddin JB, Gould AR. Relationships between members of the *Mycoplasma mycoides* cluster as shown by DNA probes and sequence analysis. *Int J Syst Bacteriol.* 1992 Oct;42(4):593-601.

27. Razin S, Amikam D, Glaser G. Mycoplasmal ribosomal RNA genes and their use as probes for detection and identification of Mollicutes. *Isr J Med Sci.* 1984 Sep;20(9):758-61.
28. Tenk M. Examination of *Mycoplasma bovis* infection in cattle. Szent Istvan University, postgraduate school of veterinary science, Budapest 2005.
29. Ayling RD, Bashiruddin SE, Nicholas RA. Mycoplasma species and related organisms isolated from ruminants in Britain between 1990 and 2000. *Vet Rec.* 2004 Oct 2;155(14):413-6.
30. Taylor TK, Bashiruddin JB, Gould AR. Relationships between members of the *Mycoplasma mycoides* cluster as shown by DNA probes and sequence analysis. *Int J Syst Bacteriol.* 1992 Oct;42(4):593-601.
31. Guerrieri, F. Towards Sustainable CBPP Control Programmes For África. Food And Agriculture Organization Of The United Nations. (FAO), 2003: 1- 42.
32. Adegboye DS, Halbur PG, Cavanaugh DL *et al.*, Immunohistochemical and pathological study of *Mycoplasma bovis*-associated lung abscesses in calves. *J Vet Diagn Invest* 1995;7:333-337.
33. Pilo P, Frey J, Vilei EM. Molecular mechanisms of pathogenicity of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Vet J.* 2007 Nov;174(3):513-21.
34. Sachse K, Salam HS, Diller R, Schubert E, Hoffmann B, Hotzel H. Use of a novel real-time PCR technique to monitor and quantitate *Mycoplasma bovis* infection in cattle herds with mastitis and respiratory disease. *Vet J.* 2010 Dec;186(3):299-303.
35. Sachse K, Pfützner H, Hotzel H, Demuth B, Heller M, Berthold E. Comparison of various diagnostic methods for the detection of *Mycoplasma bovis*. *Rev Sci Tech.* 1993 Jun;12(2):571-80.
36. Minion FC. Molecular pathogenesis of mycoplasma animal respiratory pathogens. *Front Biosci.* 2002 1;7:1410-22.
37. Rodríguez JL, Poveda JB, Gutiérrez C, Acosta B, Fernández A. Poliartitis in kids associated with *Mycoplasma putrefaciens*. *Veterinary Record* 1996;135:406-407.
38. Sachse K, Helbig JH, Lysnyansky I, Grajetzki C, Müller W, Jacobs E, Yogev D. Epitope mapping of immunogenic and adhesive structures in repetitive domains of *Mycoplasma bovis* variable surface lipoproteins. *Infect Immun.* 2000 Feb;68(2):680-7.

## 7.0 CONCLUSIONES

- *Mycoplasma* spp., fue aislada en el 33%, de las muestras analizadas de hisopos nasales y pulmón de bovinos con problemas respiratorios.

- *Mycoplasma bovis* la especie mayormente identificada bioquímicamente en 54 (38 %), y le siguen en menor porcentaje *M. dispar* 36 (25%), *Mycoplasma* del grupo *mycoides* 17 (12%), *M. californicum* 8 (5%), *Mycoplasma arginini* 2 (1 %), *M. bovis genitalium* y *M. alkalescens* 1 (0.8 %) y *Mycoplasma* spp., 10 (7%).

- Se logró la identificación de *M. bovis* 56 (39.7 %), *M. dispar* 35 (25%), *Mmmc* 22 (16 %) con las técnicas moleculares (PCR y las enzimas de restricción) de los aislados identificados como *Mycoplasma* spp., 16 (11%), datos muy cercanos a la tipificación bioquímica.

- Con el valor de Kappa para *M. bovis* y *M. dispar* si presentan concordancia entre las pruebas bioquímicas y las moleculares excepto para el grupo *mycoides*. La tipificación de *Mmmc* se realizó en ensayo con enzimas de restricción para este grupo ya que con los iniciadores no se logró la identificación.

- Los aislados de *Pasteurella* sp 22 (5.8 %), *Mannheimia* sp 18 (4.8 %) e *Histophilus* sp 2 (0.5 %). No mostró correlación con las muestras positivas a *Mycoplasma* spp., con el valor p mayor a 0.05 con la prueba No paramétrica de Sperman

39. Lysnyansky, I., Rosengarten, R., and Yogev, D. Phenotypic switching of variable surface lipoproteins in *Mycoplasma bovis* involves high-frequency chromosomal rearrangements. *J Bacteriol* 1996.178: 5395-5401.
40. Lysnyansky, I., Sachse, K., Rosenbusch, R., Levisohn, S., and Yogev, D. The *vsp* locus of *Mycoplasma bovis*: gene organization and structural features. *J Bacteriol* 1999. 181: 5734-5741.
41. Nussbaum, S., Lysnyansky, I., Sachse, K., Levisohn, S., and Yogev, D. (2002) Extended repertoire of genes encoding variable surface lipoproteins in *Mycoplasma bovis* strains. *Infect Immun* 70: 2220-2225.
42. Geary SJ, Tourtellotte ME, Cameron JA. Inflammatory toxin from *Mycoplasma bovis*: isolation and characterization. *Science*. 1981 May 29;212(4498):1032-3.
43. McAuliffe L, Richard J. E, Miles K, Ayling RD, and Robin A. J. Nicholas. Biofilm formation by mycoplasma species and its role in environmental persistence and survival. *Microbiology* (2006), 152, 913–922.
44. Fuentes-García G., Cedillo-Ramírez L., Rivera-Tapia J.A., Formación de biopelículas por micoplasmas de importancia médica. *Univ. Med. Bogotá* 2009. 50 (1): 12-19.
45. Megid R, Nicholas RA, Miles RJ. Biochemical characterization of *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma dispar* and recent bovine isolates of *Mycoplasma canis*. *Vet Res Commun*. 2001 Jan;25(1):1-12.
46. Gyles, C.L., *et al*: Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. 4<sup>th</sup> ed. Wiley-Blackwell , Iowa, 2010.
47. Almeida RA, Wannemuehler MJ, Rosenbusch RF. Interaction of *Mycoplasma dispar* with bovine alveolar macrophages. *Infect Immun*. 1992 Jul;60(7):2914-9.
48. Birberstein E.; Zee, Yuan Chung. “Tratado de microbiología veterinaria”.Ed. Acribia S.A., 1994.
49. Rosendal S, Levisohn S, Gallily R. Cytokines induced in vitro by *Mycoplasma mycoides* ssp. *mycoides*, large colony type. *Vet Immunol Immunopathol*. 1995 Feb;44(3-4):269-78.
50. Maniloff Jk. *Mycoplasmas. Molecular Biology and Pathogenesis*. Departament of Microbiolgy and Immunology University Rochester. New York. 2005.
51. Maunsell FP, Donovan GA, Risco C, Brown MB. Field evaluation of a *Mycoplasma bovis* bacterin in young dairy calves. *Vaccine*. 2009 May 11;27(21):2781-8.

52. Pleuroneumonia Contagiosa Bovina. Capítulo 2.4.9. OIE (Organización Internacional de Epizootias). Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2008. Abril 02 2009.
53. Bradbury JM. Gordon Memorial Lecture. Poultry mycoplasmas: sophisticated pathogens in simple guise. Br Poult Sci. 2005 Apr;46(2):125-36
54. Edward DG, Freunt EA. The classification and nomenclature of organisms of the pleuropneumonia group. J Gen Microbiol. 1956;14:197-207.
55. Hale HH, HEelmboldt CF, Plastridge WN, Stula EF. Bovine mastitis caused by a *Mycoplasma* species. Cornell Vet. 1962 Oct;52:582-91.
56. Thomas LH, Howard CJ, Gourlay RN. Isolation of *Mycoplasma agalactiae* var *bovis* from a calf pneumonia outbreak in the south of England. Vet Rec. 1975 Jul 19;97(3):55-6.
57. Langford EV. *Mycoplasma agalactiae* subsp. *bovis* in pneumonia and arthritis of the bovine. Can J Comp Med. 1977 Jan;41(1):89-94.
58. Muenster OA, Ose EE, Matsuoka T. The incidence of *Mycoplasma dispar*, *Ureaplasma* and conventional *Mycoplasma* in the pneumonic calf lung. Can J Comp Med. 1979 Oct;43(4):392-8.
59. Hewicker-Trautwein M, Peters M, Gruber A, Baum B, Liverköhne I, Buchenau I, Kleinschmidt S. Bronchopneumonia and polyarthritis due to *Mycoplasma bovis* in a calf. Dtsch Tierarztl Wochenschr. 2003 Apr; 110 (4) :147-50.
60. McAuliffe L, Kokotovic B, Ayling RD, Nicholas RA. Molecular epidemiological analysis of *Mycoplasma bovis* isolates from the United Kingdom shows two genetically distinct clusters. J Clin Microbiol. 2004 Oct;42(10):4556-65.
61. Kuniyasu C, Yoshida Y, Ueda H, Sugawara H, Ito Y. Isolation of *Mycoplasma dispar* from pneumonic calf lungs in Japan. Natl Inst Anim Health Q (Tokyo). 1977 Summer;17(2):75-6.
62. Tinant MK, Bergeland ME, Knudtson WU. Calf pneumonia associated with *Mycoplasma dispar* infection. J Am Vet Med Assoc. 1979 Oct 15;175(8):812-3.
63. Martin SW, Bateman KG, Shewen PE, Rosendal S, Bohac JG, Thorburn M. A group level analysis of the associations between antibodies to seven putative pathogens and respiratory disease and weight gain in Ontario feedlot calves., Can J Vet Res. 1990 Jun;54(3):337-42.

64. Virtala AM, Mechor GD, Gröhn YT, Erb HN, Dubovi EJ. Epidemiologic and pathologic characteristics of respiratory tract disease in dairy heifers during the first three months of life. *J Am Vet Med Assoc.* 1996 Jun 15;208(12):2035-42
65. Thomas A, Ball H, Dizier I, Trolin A, Bell C, Mainil J, Linden A. Isolation of mycoplasma species from the lower respiratory tract of healthy cattle and cattle with respiratory disease in Belgium. *Vet Rec.* 2002 Oct 19;151(16):472-6.
66. <http://web.oie.int/wahis/public.php?page=home>. World Animal Health Information Database (WAHID) Interface. 19 Septiembre 2011.
67. Acuerdo mediante el cual se enlistan las enfermedades y plagas de los animales, exóticas y endémicas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos. *Diario Oficial de la Federación.* SAGARPA. Consultado 08 Enero 2011.
68. Informe de las actividades para el reconocimiento de México por parte de la OIE con respecto a la encefalopatía espongiiforme bovina y perineumonía contagiosa bovina. Comisión México – Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales. Consultado 08 Enero 2011.
- 69.
70. Jaramillo ML, Díaz OF Pruebas para el diagnóstico de micoplasmosis bovina Red de Innovación en Salud Animal CENID – Microbiología INIFAP 2009.
71. Ramírez RR, Chavarrla MB, Nevárez GMA *et al.*, Demostración Inmunohistoquímica de *Mycoplasma bovis* en lesiones neumónicas crónicas en ganado en corral de engorda. *Notas de Investigación. Vet. Méx.*, 41(4) 2010: 289-296.
72. Jaramillo ML, Aguilar RF, Salas TE. Aislamiento de *Mycoplasma bovis* de neumonías de becerros. *Memorias XIII Congreso Nacional de Buiatría*, 1987;328-331.
73. Ávila S, Domínguez J, Ruiz H, Valdivieso A, De la Peña A. Evaluación de un brote de mastitis por *Mycoplasma bovis* y otros agentes etiológicos en un hato productor de leche. *Memorias del IX Congreso Nacional de Buiatría*; 1983 Junio 21-23; Puebla (Puebla) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC, 1983:118-124.
74. Rojas-Trejo V. Tipificación de *Mycoplasma bovis* de muestras de leche de bovino procedente de tanque de almacenamiento (Tesis de licenciatura) México (DF) México. Universidad Nacional Autónoma de México 2008.



75. Nuñez CD, Morales SE, Martínez MJJ, Hernández LA. Detección de mastitis bovina subclínica por micoplasmosis mediante ELIS indirecta y aislamiento. *Vet. Mex* 39 2008;(2):161-171.
76. Daniel WW. *Bioestadística base para el análisis de las ciencias de la Salud* 4ta Ed. México: Limusa Wiley, 2002.
77. Hayflick L. Tissue cultures and mycoplasmas. *Tex Rep Biol Med.* 1965 ;23:Suppl 1:285.
78. Howard WW, Rosenbusch FR, Lauerman HL, *Mycoplasmosis in animals: Mycoplasmosis committee of American association of veterinary laboratory diagnosis*;1994. EE UU. Iowa State University Press.
79. Sambrook J and Russell WD. *Molecular cloning a laboratory manual* Vol.1. 3rd ed. Cold Spring Harbor New York. Estados Unidos, 2001:6.61-6.62.
80. Hotzel H, Heller M, Sachse K. Enhancement of *Mycoplasma bovis* detection in milk samples by antigen capture prior to PCR. *Mol and Cell Probes* 1999;13:175-178.
81. Hirose K, Kobayashi H, Ito N, Kawasaki Y, Zako M, Kotani K, Ogawa H, Sato H. Isolation of *Mycoplasmas* from nasal swabs of calves affected with respiratory diseases and antimicrobial susceptibility of their isolates. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2003 Sep; 50 (7) :347-51.
82. Wiggins MC, Woolums AR, Sanchez S, Hurley DJ, Cole DJ, Ensley DT, Pence ME. Prevalence of *Mycoplasma bovis* in backgrounding and stocker cattle operations. *J Am Vet Med Assoc.* 2007 15;230(10):1514-8.
83. White BJ, Hanzlicek G, Sanderson W *et al.*, Mollicutes species and *Mycoplasma bovis* prevalence and association with health outcomes in beef feeder calves at arrival and initial treatment for bovine respiratory disease. *Can Vet J* 2010;51:1061-1018.
84. Kusiluka LJ, Ojeniyi B, Friis NF. Increasing prevalence of *Mycoplasma bovis* in Danish cattle. *Acta Vet Scand.* 2000;41(2):139-46.
85. Härtel H, Nikunen S, Neuvonen E, Tanskanen R, Kivelä SL, Aho R, Soveri T, Saloniemi H. Viral and bacterial pathogens in bovine respiratory disease in Finland. *Acta Vet Scand.* 2004;45(3-4):193-200.
86. Fulton RW, Blood KS, Panciera RJ, Payton ME, Ridpath JF, Confer AW, Saliki JT, Burge LT, Welsh RD, Johnson BJ, Reck A. Lung pathology and infectious agents in fatal feedlot pneumonias and relationship with mortality, disease onset, and treatments. *J Vet Diagn Invest.* 2009 Jul;21(4):464-77.

87. Gabinaitiene A, Siugzdaite J, Zilinskas H, Siugzda R, and Petkevicius S. *Mycoplasma bovis* and bacterial pathogens in the bovine respiratory tract. (a) Vet Med-Czech. 2011(a) (1):28-34.
88. Chazel M, Tardy F, Le Grand D, Calavas D, Poumarat F. *Mycoplasmoses* of ruminants in France: recent data from the national surveillance network. BMC Vet Res. 2010 Jun 7;6:32.
89. Haines DM, Martin KM, Clark EG, Kee Jim G, Janzen ED. The Immunohistochemical detection of *Mycoplasma bovis* and bovine viral diarrhoea virus in tissues of feedlot cattle with chronic, unresponsive respiratory disease and/or arthritis. Can Vet J. 2001;42:857–86.
90. NMC Publication "Laboratory and Field Handbook on Bovine Mastitis" (1999) pg. 171.
91. Shahriar FM, Clark EG, Janzen E, West K, Wobeser G. Coinfection with bovine viral diarrhoea virus and *Mycoplasma bovis* in feedlot cattle with chronic pneumonia. Can Vet J. 2002 Nov;43(11):863-8.
92. Romero RR, Chavarria BC, Nevárez GM, Rodríguez LE, Demostración Inmunohistiquímica de *Mycoplasma bovis* en lesiones neumónicas. Vet, Mex. 2010;41;4:289-296.
93. Rifatbegović M, Assunção P, Poveda JB, Pasić S. Isolation of *Mycoplasma bovis* from the respiratory tract of cattle in Bosnia and Herzegovina. Vet Rec. 2007 Apr 7; 160 (14) :484-5. PubMed PMID:17416726.
94. Gevaert D. [The importance of *Mycoplasma bovis* in bovine respiratory disease]. Tijdschr Diergeneeskd. 2006 Feb 15; 131 (4) :124-6.
95. Binder A, Amtsberg G, Dose S, Fischer W, Scholz H, Kirchhoff H. [Examination of cattle with respiratory diseases for *Mycoplasma* and bacterial bronchopneumonia agents]. Zentralbl Veterinarmed B. 1990 Aug;37(6):430-5.
96. González RN, Wilson DJ. *Mycoplasmal* mastitis in dairy herds. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 2003 Mar; 19 (1) :199-221.
97. Pfützner H, Sachse K. *Mycoplasma bovis* as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders in cattle. Rev Sci Tech. 1996 Dec; 15 (4) :1477-94.
98. Soehnlen MK, Aydin A, Murthy KS, Lengerich EJ, Hattel AL, Houser BA, Fenton GD, Lyszczek HR, Burns CM, Townsend AM, Brooks JW, Wolfgang DR, Jayarao BM. Epidemiology of *Mycoplasma bovis* in Pennsylvania veal calves. J Dairy Sci. 2012 Jan;95(1):247-54.

99. Shimizu T. Isolation of *Mycoplasma bovis* from calf pneumonia in Japan. Nippon Juigaku Zasshi. 1982 Dec; 44 (6) :981-3.
100. International Committee on Systematics of Prokaryotes; Subcommittee on the taxonomy of *Mollicutes*. Int J Syst Evol Microbiol. 2011 (61); 695-697.
101. Madoff S, Pixley BQ, DelGiudice RA, Moellering RC Jr. Isolation of *Mycoplasma bovis* from a patient with systemic illness. J Clin Microbiol. 1979; 9 (6) :709-11.
102. Allan EM, Obi TU, Wisemen A, Cornwell HJ, Selman IE, Msolla PM, Pirie HM. The isolation of *Mycoplasma bovis* from pneumonic calves in Scotland. Vet Rec. 1978 Aug 12; 103 (7) :139.
103. Nicholas RAJ, Ayling RD. Recent developments in the diagnosis and control of *mycoplasma* infections in cattle. 23 Congreso Mundial de Buiatria Quebec, Canadá. Del 11 al 16 de Julio 2004.
104. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". Second Edition. Vol. 1, 2, 3, 4, 5. Ed. Springer. 2001.
105. Cowan y Steel's "Manual para la identificación de bacterias de importancia médica". Ed. CECSA. 1974.
106. Davies, E.T. "Manual de investigación veterinaria. Técnicas de laboratorio. Volumen I, y II". Ed. Acribia, 1990.
107. Brice N, Finlay D, Bryson DG, Henderson J, McConnell W, Ball HJ. Isolation of *Mycoplasma bovis* from cattle in Northern Ireland, 1993 to 1998. Vet Rec. 2000 May 27;146(22):643-4.
108. Eichwald C, Friedrich I, Trelldenier H. Micoplasmosis de los animals. Editorial Acribia. Zaragoza España;1973.
109. Howard CJ, Stoti EJ, Thomas LH, Gourlay RN and Taylor G. Protection against respiratory disease in calves induced by vaccines containing respiratory syncytial virus, parinfluenza type 3 virus, mycoplasma bovis and m. Dispar. Veterinary record 1987; 121: 372-376.
110. Razin S, *The Mycoplasmas*. Microbiol Rev 1978;42:414-470.
111. Rivera-Tapia J, Cedilli-Ramirez ML, Vega-Benítez M. Micoplasmas y su importancia médica. Rev Biomed 2001; 12:262-271.

112. The Center for Food Security and Public Health. Contagious Bovine Pleuropneumonia . OIE (Organización Internacional de Epizootias). Junio 26 2008; 1-5.
113. Lamm CG, Munson L, Thurmond MC, Bradd C, George W. *Mycoplasma* otitis in California calves. *J Vet Diagn Invest* 16:397–402.
114. Walz PH, Mullaney TP, Render JA, Walker RD, Mosser T, Baker JC. Otitis media in preweaned Holstein dairy calves in Michigan due to *Mycoplasma bovis*. *J Vet Diagn Invest*. 1997 Jul;9(3):250-4.
115. Nicholas RA. Bovine mycoplasmosis: silent and deadly. *Vet Rec*. 2011 Apr 2004;30;168(17):459-62.
116. Xin J, Li Y, Nicholas RA, Chen C, Liu Y, Zhang MJ, Dong H. A history of the prevalence and control of contagious bovine pleuropneumonia in China. *Vet J*. 2012 Feb;191(2):166-70. Epub 2011 Mar 24.
117. Thiaucourt F, Manso-Silvan L, Salah W, Barbe V, Vacherie B, Jacob D, Breton M, Dupuy V, Lomenech AM, Blanchard A, Sirand-Pugnet P. *Mycoplasma mycoides*, from "mycoides Small Colony" to "capri". A microevolutionary perspective. *BMC Genomics*. 2011. 16; 12:114.
118. Szeredi L, Jánosi S, Pálfi V. Microbiological and pathological examination of fatal calf pneumonia cases induced by bacterial and viral respiratory pathogens. *Acta Vet Hung*. 2010 Sep;58(3):341-56.
119. Griffin D, Chengappa MM, Kuszak J, McVey DS. Bacterial pathogens of the bovine respiratory disease complex. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 2010 Jul;26(2):381-94.
120. Caswell JL, Bateman KG, Cai HY, Castillo-Alcala F. *Mycoplasma bovis* in respiratory disease of feedlot cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 2010 Jul;26(2):365-79. Epub 2010 May 14.
121. Gulliksen SM, Jor E, Lie KI, Løken T, Akerstedt J, Østerås O. Respiratory infections in Norwegian dairy calves. *J Dairy Sci*. 2009 Oct;92(10):5139-46
122. Bencina D. Haemagglutinins of pathogenic avian mycoplasmas. *Avian Pathol*. 2002 Dec;31(6):535-47.
123. Knudtson WU, Reed DE, Daniels G. Identification of *Mycoplasmatales* in pneumonic calf lungs. *Vet Microbiol*. 1986 Feb;11(1-2):79-91.
124. Tanskanen R. Transmission of *Mycoplasma dispar* among a succession of newborn calves on a dairy farm. *Acta Vet Scand*. 1987;28(3-4):349-60.

125. Shiferaw G, Tariku S, Ayelet G, Abebe Z. Contagious caprine pleuropneumonia and Mannheimia haemolytica-associated acute respiratory disease of goats and sheep in Afar Region, Ethiopia. Rev Sci Tech. 2006 Dec;25(3):1153-63.
126. Foster AP, Naylor RD, Howie NM, Nicholas RA, Ayling RD. Mycoplasma bovis and otitis in dairy calves in the United Kingdom. Vet J. 2009 Mar;179(3):455-7. Epub 2007 Dec 19.
127. Gagea MI, Bateman KG, Shanahan RA, van Dreumel T, McEwen BJ, Carman S, Archambault M, Caswell JL. Naturally occurring Mycoplasma bovis-associated pneumonia and polyarthritis in feedlot beef calves. J Vet Diagn Invest. 2006 ;18(1):29-40.
128. Thomas A, Sachse K, Farnir F, Dizier I *et al.*, Adherence of *Mycoplasma bovis* to bovine bronchial epithelial cells. Microbial Pathogenesis 34; 2003: 141-148.
129. Bednarek D, Ayling RD, Nicholas RA, Dudek K, Szymanska-Czerwinska M. Serological survey to determine the occurrence of respiratory Mycoplasma infections in the Polish cattle population. Vet Rec. 2012 Jun 26.
130. McAuliffe L, Ellis RJ, Ayling RD, Nicholas RA. Differentiation of Mycoplasma species by 16S ribosomal DNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting. J Clin Microbiol. 2003 Oct;41(10):4844-7.
131. Duff GC, Galyean ML. Board-invited review: recent advances in management of highly stressed, newly received feedlot cattle. J Anim Sci. 2007 Mar;85(3):823-40.
132. Talkhan OA, Samya EL-M, Kholy MEL, Mosallam S, Atwa EI. Bacterial Agent of Respiratory Manifestation in Cattle and The Associated Biochemical Alterations in Menoufeya Governorate Nature and Science. 2009;7(9):26-30.
133. Hernández AL, González GA, Campos RV, Payan RM, Jaramillo ML, Pérez DM. Reporte de un caso de mastitis provocado por *Mycoplasma bovis* en un hato lechero. Memorias del X Congreso Nacional de Buiatría; 1984 Agosto 19-22; Acapulco (Guerrero) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC, 1984:608-609.
134. Delgado GR. Neumonía y otitis en becerros Holstein asociadas a infección por *Mycoplasma bovis*. Memorias XIX Congreso Nacional de Patología Veterinaria, 2010: 306-315.

135. Levisohn S, Garazi S, Gerchman I, Brenner J. Diagnosis of a mixed mycoplasma infection associated with a severe outbreak of bovine pinkeye in young calves. *J Vet Diagn Invest.* 2004 Nov;16(6):579-81.
136. Dybvig K, Voelker L, Molecular biology of Mycoplasmas. *Annu Rev Microbiol.* 50:25-57. 1996.
137. Maniloff J and Morowitz HJ. Cell biology of the *Mycoplasmas*. *Bacteriol. Rev. American Society for Microbiology* 1972;36: 263-290.
138. Rosengarten R, Behres A, Stetefeld A, Heller M, Ahrens M, Sachse K, *et al.* Antigen heterogeneity among isolates of *Mycoplasma bovis* is generated by high-frequency variation of diverse membrana surface proteins. *Infect Immun* 1994; 62:5066-5074.

## APÉNDICE

### Medio de cultivo de Hayflick.

REACTIVOS	CANTIDAD
PPLO <sup>12</sup>	2,1 g
Agua destilada	70 ml
Esterilizar 121°C, 20 lb. Por 15 min.	
Extracto de levadura fresco 10 %	10 ml
Rojo de fenol <sup>13</sup> 1 %	1 ml
Suero equino <sup>14</sup>	20 ml
Glucosa <sup>15</sup>	10 ml
Penicilina <sup>16</sup> 100,000 u/ml	1 ml

Hayflick semi-sólido.

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

Reactivo	CANTIDAD
Hayflick líquido	60 ml
Agar Noble 0,8 % (estéril)	10 ml

---

<sup>12</sup> Lab. DIFCO

<sup>13</sup> Lab. MERCK

<sup>14</sup> Previamente estéril por filtración

<sup>15</sup> Lab. OXOID

<sup>16</sup> Lab. LA PISA

POPAGACIÓN DE CEPAS TIPO (100 ml) Y ASILADOS DE MICOPLASMA (30 ml).

CEPA CON 24 HRS. DE INCUBACIÓN 2 ML.

\*

SE AGREGÓ 8 ML DE MEDIO LIQUIDO HAYFLICK PARA  
AFORAR A 10 ML

\*

SE AGREGÓ 40/15 ML DE MEDIO LIQUIDO HAYFLICK PARA AFORAR

Cepas tipo  
*M. bovis* cepa donneta  
*M. dispar*  
*Mmmc*  
50 ml

Aislados de *Mycoplasma*  
25 ml

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