



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**“Estandarización de la técnica PCR multiplex de las especies de
Mycoplasma asociadas al Complejo Respiratorio Bovino (CRB)”.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:

LINDA MARLENNE MAYA RODRÍGUEZ

TUTORA PRINCIPAL:

DRA. ROSA ELENA MIRANDA MORALES

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA UNAM

COMITÉ TUTORAL:

DRA. LAURA JARAMILLO MEZA

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD
ANIMAL

DR. FRANCISCO J. TRIGO TAVERA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA UNAM

MÉXICO D.F. DICIEMBRE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

DEDICATORIA	Pag. 5
AGRADECIMIENTO	Pag. 6
RESEMEN	Pag. 7
ABSTRACT	Pag. 8
1. INTRODUCCIÓN	Pag. 9
1.1 Importancia de la producción de leche	Pag. 9
1.1.1 Producción de leche en el mundo	Pag. 10
1.1.2 Producción de leche en nuestro país	Pag. 10
1.2 Interacción de virus y bacterias	Pag. 11
1.3 Importancia del CRB	Pag. 11
1.4 Etiología	Pag. 12
1.5 Signos clínicos y lesiones	Pag. 13
1.6 Generalidades del género <i>Mycoplasma</i> sp.	Pag. 14
1.6.1 Cultivo in vitro.	Pag. 14
1.6.2 Identificación del género.	Pag. 15
1.6.3 Características estructurales	Pag. 16
1.6.4 Características Metabólicas	Pag. 16
1.6.5 Características Moleculares	Pag. 17
1.6.6 Propiedades de patogenicidad.	Pag. 17
1.6.6.1 Adhesinas	Pag. 18
1.6.6.2 Cápsula	Pag. 20
1.6.6.3 Biopelícula	Pag. 20
1.6.6.4 Variabilidad antigénica y de fase	Pag. 21
1.6.6.5 Plásmidos	Pag. 23
1.6.6.6 Toxinas	Pag. 24
1.6.6.7 Sistemas de transporte	Pag. 24
1.7 Los Micoplasmas en el CRB	Pag. 25
1.7.1 Especies de micoplasmas más frecuentes en el CRB	Pag. 25
1.7.2 <i>Mycoplasma bovis</i>	Pag. 26
1.7.3 <i>Mycoplasma dispar</i>	Pag. 26
1.7.4 <i>Mycoplasma bovirhinis</i>	Pag. 27
1.8 Situación del CRB en el mundo	Pag. 27
1.8.1 Virus	Pag. 28
1.8.2 Bacterias	Pag. 28
1.9 Situación del CRB en México	Pag. 29
1.10 La importancia del CRB en las unidades de producción	Pag. 29
JUSTIFICACIÓN	Pag. 32
Objetivo general	Pag. 33
Objetivos específicos	Pag. 33
HIPÓTESIS	Pag. 34
2. MATERIAL Y MÉTODOS.	Pag. 35
2.1 ZONA DE ESTUDIO.	Pag. 35
2.1.1 Grupos de estudio.	Pag. 35
2.1.2 Cálculo del tamaño de muestra.	Pag. 35
2.1.3 Colección de muestras	Pag. 36
2.1.4 Muestras colectadas.	Pag. 36
2.2 PROCESAMIENTO DE LOS HISOPADOS NASALES PARA EL	Pag. 37

AISLAMIENTO DE MICOPLASMAS.....	
2.2.1 Determinación del género <i>Mycoplasma</i> sp de las cepas aisladas.....	Pag. 38
2.3 PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA PARA LA EXTRACCIÓN DE DNA.....	Pag. 38
2.3.1 Crecimiento de las cepas aisladas.....	Pag. 39
2.3.2 Crecimiento de las cepas tipo.....	Pag. 39
2.3.3 Extracción de DNA.....	Pag. 40
2.4 PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DEL GÉNERO <i>Mycoplasma</i> sp. MEDIANTE LA PCR ARNr 16S.....	Pag. 41
2.4.1 Reacción para la PCR RNAr 16s.....	Pag. 43
2.4.2 Amplificación del fragmento RNAr 16s.....	Pag. 43
2.5 ESTANDARIZACIÓN DE LA PCR MULTIPLEX.....	Pag. 44
2.5.1 Reacción para la PCR multiplex.....	Pag. 49
2.5.2 Amplificación de los fragmentos de la PCR multiplex.....	Pag. 50
2.6 PCR PARA LA IDENTIFICACIÓN DE <i>Mycoplasma</i> sp. del grupo <i>mycoides</i>	Pag. 51
2.6.1 Reacción para la PCR de <i>Mycoplasma</i> sp. del grupo <i>mycoides</i>	Pag. 52
2.6.2 Amplificación de los productos de la PCR para <i>Mycoplasmas</i> sp. del grupo <i>mycoides</i>	Pag. 53
2.6.3 Digestión enzimática para la identificación de la subespecies <i>capri</i> y <i>mycoides</i> de <i>Mycoplasma mycoides</i>	Pag. 53
2.7 CANTIDAD NECESARIA DE DNA PARA LAS DISTINTAS PCRS.....	Pag. 55
3. RESULTADOS.....	Pag. 56
3.1 MUESTRAS POSITIVAS AL AISLAMIENTO Y PCR 16'S ARNr PARA EL GÉNERO <i>Mycoplasma</i> sp.....	Pag. 56
3.1.1 Muestras positivas al aislamiento del género <i>Mycoplasma</i> sp.....	Pag. 56
3.1.2 Muestras positivas a la PCR ARNr 16s para el género <i>Mycoplasma</i> sp. a partir de los hisopos nasales.....	Pag. 57
3.2 IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE <i>Mycoplasma bovis</i> , <i>M. dispar</i> , <i>M. bovirhinis</i> POR LA PCR MULTIPLEX.....	Pag. 59
3.2.1 Identificación de las especies por PCR multiplex a partir de las muestras positivas a la PCR ARNr 16s.....	Pag. 59
3.2.2 Detección de <i>M. bovis</i> , <i>M. bovirhinis</i> y <i>M. dispar</i> por PCR multiplex a partir de los aislados, identificados como <i>Mycoplasma</i> sp.....	Pag. 60
3.3 IDENTIFICACIÓN POR PCR PARA <i>Mycoplasma</i> sp. DEL GRUPO MYCOIDES.....	Pag. 61
3.3.1 Detección de las subespecies <i>capri</i> y <i>mycoides</i> del grupo <i>mycoides</i>	Pag. 62
3.4 ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DE LAS ESPECIES POR LUGARES MUESTREADOS Y ESTADO DE LA ENFERMEDAD RESPIRATORIA EN LAS ZONAS DE ESTUDIO.....	Pag. 63
3.4.1 Distribución de las especies según la ubicación de las zonas de estudio.....	Pag. 63
3.4.2 Frecuencias de las diferentes especies según los	

antecedentes de enfermedades respiratorias en las UPL con y sin antecedentes de enfermedad respiratoria.	Pag. 64
3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ESTUDIO.	Pag. 65
3.5.1 Comparación de las metodologías de aislamiento y las PCRs para la detección de las especies de micoplasmas, mediante la prueba de Kappa.	Pag. 65
3.5.2 Análisis de la detección del género <i>Mycoplasma</i> sp. y la PCR multiplex de aislados e hisopos nasales.	Pag. 66
3.5.3 Análisis estadístico de las especies identificadas con la PCR multiplex en las muestras positivas en este estudio.	Pag. 66
3.5.4 Identificación de las especies <i>M. bovis</i> , <i>M. dispar</i> y <i>M. bovirhinis</i> por la PCR multiplex a partir de las muestras directas.	Pag. 67
4. DISCUSIÓN	Pag. 69
5. CONCLUSIONES	Pag. 75
6. REFERENCIAS	Pag. 77

DEDICATORIA

"Dicen que el carácter de las personas se mide por como hacen frente a las situaciones difíciles de la vida, yo digo que el carácter se forja por las situaciones que se te presentan, a veces fallas en las decisiones, otras no, pero siempre mientras vivas, tendrás la oportunidad de hacer frente y aprender, porque finalmente a eso hemos venido a aprender y a disfrutar de la vida." Marlenne Maya

Este trabajo es para mis padres, **Raúl Maya** y **Rufina Rodríguez**, quienes además de darme la vida me han dado consejo y apoyo en todo momento, se que siempre podré contar con ustedes.

Para mis hermanos, **Jaret Maya** y **Donato Maya**, por todo lo que hemos compartido y porque para siempre habrá lazos que nos unan.

Mis amigas **Chiquis^t** y **Panina**, quienes sin hablar me dan su cariño incondicional en las buenas y en las malas.

AGRADECIMEINTOS

Agradezco a la Dra. Rosa Elena Miranda, por permitirme estar de nuevo en su equipo de trabajo, por su apoyo y por compartir con una servidora sus conocimientos en el trabajo y en la vida.

A mi comité tutor, conformado por la Dra. Laura Jaramillo y el Dr. Francisco Trigo, a quienes agradezco profundamente el seguimiento e interés que mostrarón siempre en mi formación académica.

A los miembros de mi jurado, Dra. Susana Mendoza, Dr. Efren Díaz, Dr. Rubén Oliver y Dr. Alfredo Saghun, por su ayuda en la revisión de mi trabajo, así como en la culminación de este proyecto.

Al equipo de trabajo del laboratorio de Micoplasma: Verónica Rojas, Cuahutemoc López, Tonathui López, Maricela Osorio, Joselyn López y Jaramar Balmori.

Al departamento de Microbiología e inmunología de la FMVZ-UNAM

A mis amigas y hermanas Fabiola Ávila y Martha Juárez.

Al proyecto PAPPIT IN222412-3, por el financiamiento de mi proyecto.

RESUMEN

El complejo respiratorio bovino (CRB), es una enfermedad que ocasiona grandes pérdidas económicas, tiene una etiología multifactorial. *Mycoplasma* sp. es una bacteria frecuentemente aislada en bovinos con problemas respiratorios. En este trabajo se estandarizó y validó una PCR multiplex para identificar a *M. bovis*, *M. dispar* y *M. bovirhinis*. Para evaluar la tecnología desarrollada, se colectaron hisopados nasales en medio Hayflick de 335 bovinos Holstein con y sin antecedentes respiratorios, de unidades lecheras de 3 estados del centro del país. Las muestras, fueron procesadas para el aislamiento de micoplasmas y para la extracción del ADN con Tiocianato de guanidina a partir de un concentrado del medio de transporte de los hisopados. Se realizó una PCR con iniciadores que identifican el gen ARN16s ribosomal del género *Mycoplasma* y se estandarizó una PCR multiplex con iniciadores específicos para una oligopéptido permeasa (*oppD* y *oppF*) para *M. bovis*, y el gen de la subunidad beta de la ARN polimerasa (*rpoB*) para *M. dispar* y *M. bovirhinis*. Se determinó la presencia de *Mycoplasmas* sp. con la PCR ARN16s ribosomal en 115 de las 335 muestras analizadas (34.3%), de las cuales, la PCR multiplex identificó 87/115 (75.6%) muestras como *Mycoplasma* sp. Dentro de las cuales, 15/ 87 (17.2%) muestras contenían más de una especie de micoplasma. La frecuencia de las especies identificadas fueron para *M. bovis* 37.3%, *M. bovirhinis* 30.4% y *M. dispar* 20%. Y en la población con antecedentes de enfermedad respiratoria, *M. bovis* 22.1%, *M. bovirhinis* 14.4 % y *M. dispar* 11.8%. El aislamiento se obtuvo de 87 muestras, identificando a *M. bovis* 40.4%, *M. bovirhinis* 20.2% y *M. dispar* 23.2%. Las tres especies de micoplasmas se encontraron en unidades con antecedentes de la enfermedad, con mayor frecuencia de *M. bovis* y de las unidades sin antecedentes únicamente se detectó a *M. bovirhinis*.

ABSTRACT

Bovine respiratory disease complex (CRB) is a multifactorial etiology disease that causes great economic losses. *Mycoplasma* sp. is a microorganism frequently isolated from dairy cows with respiratory problems. This study, standardized a multiplex PCR for the identification of *M. bovis*, *M. dispar* and *M. bovirhinis* associated at CRB. To evaluate the technique, 335 nasal swabs with Hayflick were collected from cows with and without respiratory history. They come from 3 Midwest states in Mexico. The samples were processed for *Mycoplasma* sp. isolation and DNA extraction. The guanidine thiocyanate protocol was used from a concentrate of the swabs. A PCR was carried out using primers that identify the ARNr 16s gen of *Mycoplasma* sp. The multiplex PCR was standardized using specific primers for a permease oligopeptide (*oppD* and *oppF*) for *M. bovis*, and the β subunit gen for ARN polymerase (*rpoB*) for *M. dispar* and *M. bovirhinis*. *Mycoplasma* sp. Presence was determined using PCR ARNr 16s in 1115 out of 335 samples (34.3%). Of these, the multiplex PCR identified 87/115 (75.6%) samples as *Mycoplasma* sp.; 15/87 (17.2%) samples had more than one species of mycoplasma. The frequency of the identified species was: *M. bovis* 37.3%, *M. bovirhinis* 30.4% y *M. dispar* 20%. For the population with respiratory disease history, the frequency was: *M. bovis* 22.1%, *M. bovirhinis* 14.4 % y *M. dispar* 11.8%. The micoplasma isolation was obtained from 87 samples, identifying *M. bovis* 40.4%, *M. bovirhinis* 20.2% y *M. dispar* 23.2%. The three species of *Mycoplasma* were found in dairy cows with respiratory disease history, *M. bovis* been the more frequent. In dairy cows without history only *M. bovirhinis* was detected.

1. INTRODUCCIÓN

El complejo respiratorio bovino (CRB), es una enfermedad de gran importancia, que genera grandes pérdidas económicas en las explotaciones bovinas. El CRB puede presentarse en animales que sufren estados de estrés, acompañados de agotamiento, inanición y deshidratación, como resultado del transporte prolongado y exposición a variaciones climáticas. Otros factores desencadenantes pueden ser el destete, cambios en la dieta, castración, descorne, sobrepoblación, y confinamiento en instalaciones frías, húmedas, o por la exposición a climas inclementes. (Trigo 1987).

Aun cuando el CRB, tiene una mayor presencia en el ganado para abasto de carne, es una enfermedad que afecta a todos los bovinos, en cualquier etapa y fin zootécnico, por lo que en ganado especializado en producción de leche estos padecimientos son igualmente relevantes. (FAO 2014).

1.1 Importancia de la producción de leche

Más de seis millones de personas consumen leche o productos lácteos en el mundo, encontrándose la mayoría en países en desarrollo. El consumo per cápita en los países con reporte de consumo se encuentra de la siguiente forma:

- Elevado (mayor de 150 kg al año): América del Norte, Argentina, Armenia, Australia, Costa Rica, Europa, Israel, Kirguistán y Pakistán.

- Medio (de 30 a 150 kg al año): India, Japón, Kenia, México, Mongolia, Nueva Zelandia, la República Islámica de Irán, África septentrional y meridional, la mayoría de Oriente Próximo y la mayor parte de América Latina y el Caribe.
- Bajo (menor que 130 kg por año): China, Etiopía, la mayoría de África Central y la mayor parte de Asia Oriental y Sudoriental (FAO 2014).

1.1.1 Producción de leche en el mundo

En los últimos tres decenios, la producción mundial de leche ha aumentado en más del 50%, pasando de 470 millones de toneladas en 1981 a 727 millones de toneladas en 2011. (FAO, 2014)

Los mayores productores de leche son: la India, con el 16% de la producción total, seguido por Estados Unidos de América, China, Pakistán y Brasil.

La FAO reporta en el 2014 que en cuanto a su consumo y producción los países que cuentan con un excedente son: Nueva Zelanda, Estados Unidos de América, Alemania, Francia, Australia e Irlanda.

Y los que presentan un déficit son: China, Italia, La Federación de Rusia, México, Argelia e Indonesia (FAO, 2014)

1.1.2 Producción de leche en nuestro país.

En el mes de mes de Agosto de 2013 se registró un volumen de producción mensual de 974 781 kilos de leche y un volumen acumulado de 7 171 616 kilos en la República Mexicana. Las entidades, con mayor producción de 2011-2013

fueron: Jalisco (18.8%), Coahuila (12%), Durango (8.9%), Chihuahua (8.9%), Guanajuato (7.1%), Veracruz (6.6%), Estado de México (4.4%), Puebla (3.9%), Hidalgo (3.7%), Chiapas (3.7%), Aguascalientes (3.4%), Querétaro (2.7%) y Región Lagunera (19.9%), los porcentajes están en base a su participación (SIAP/SAGARPA)

1.2 Interacción de virus y bacterias

La interacción de virus y bacterias en el CRB se ha documentado ampliamente, la información señala que los virus actúan como agentes patógenos primarios, facilitando la infección bacteriana, debido a que provocan efecto citopático directo en el aparato respiratorio, reducen la eliminación bacteriana por el epitelio mucociliar favoreciendo con ello, la adhesión y la colonización bacteriana; además, disminuyen la capacidad fagocítica de los macrófagos alveolares al causar alteraciones en los mecanismos de quimiotaxis, adhesión, ingestión y formación del complejo fagosoma-lisosoma, incluidos los mecanismos de acción lítica y degradación intracelular (Farshid, *et. al.*, 2002) y (Haines, *et. al.*, 2001).

1.3 Importancia del CRB

La importancia del CRB radica en las pérdidas económicas que ocasiona en los sistemas de producción bovina, debidas a los altos índices de mortalidad, a la baja conversión alimenticia que se registra en los animales afectados y por los costos en los tratamientos y servicios médicos, riesgo de transmisión a otros animales y pérdidas de los reemplazos. Así el impacto económico está relacionado con el

número de animales infectados dentro del hato. (Haines, *et. al.*, 2001), (Sánchez, 2010).

Al respecto, un estudio realizado en Canadá, indicó una alta frecuencia de *M. bovis* en las explotaciones analizadas, que fue del 45 al 71 % en animales de pie de cría (Haines, *et. al.*, 2001), Lo anterior, indica la relación directa que existe entre el manejo y las medidas de bioseguridad que se establecen en las unidades de producción con la diseminación de los agentes etiológicos dentro de su población. Los virus y bacterias tienen una rápida proliferación dentro de las unidades, en el caso de los micoplasmas se reporta una situación similar, por lo que una rápida identificación de los agentes involucrados es un punto crítico para el control de la enfermedad.

1.4 Etiología

El CRB tiene una etiología multifactorial, dentro de los cuales destacan algunos virus como: Herpes virus bovino-1 (VHB-1/IBR), Virus de la Parainfluenza Bovina-3 (BPIV-3), Virus de la Diarrea Viral Bovina 1 y 2 (BVDV-1–2), Virus Respiratorio Sincitial Bovino (BRSV), Adenovirus Bovino A–D (BAdV-A–D), y Coronavirus Bovino (BCoV); además de bacterias, como: *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni*, *Trueperella pyogenes* (*Arcanobacterium*) y micoplasmas, destacando dentro del género, *Mycoplasma bovis*, *M. dispar*, *M. mycoides* subsp *mycoides* (SC) y *M. mycoides* subsp *capri* (LC) (Sorden, *et. al.*, 2000), (Storz, *et. al.*, 1996), (Fulton, *et. al.*, 2000), (Bednarek, *et. al.*, 2012), (Howard, *et. al.*, 1976), (Rosengarten and Citti, 1999). Finalmente y aunque es

considerado microbiota de la cavidad nasal de los bovinos, *M. bovirhinis* se ha recuperado de casos de neumonía (Angen, *et. al.*, 2009)

1.5 Signos clínicos y lesiones

Los virus y bacterias del CRB pueden causar un estado febril, tos, producción de moco y neumonías en general, particularmente en estudios realizados en África con animales que cursaron con cuadros clínicos, se aprecian lesiones típicas en pulmones de un 40-70% entre las cuales, en cuanto a importancia, destacan la neumonía causada por *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC cuya característica es la presencia de fibrina junto con zonas rojas cerezas que pasan al gris (Amanfu, 2009)

Los problemas respiratorios de etiología bacteriana en general se asocian con neumonías, bronconeumonías y neumonías fibrinosas.

Los hallazgos a la necropsia pueden dar un indicio de la bacteria que se encuentra involucrada. *Mannheimia haemolytica* serotipo A1 induce neumonías de tipo fibrino-necróticas y hemorrágicas, (Aschenbroich *et. al.*, 2013). *Pasteurella* sp. neumonías de tipo fibrinoso, finalmente *Actinomyces pyogenes* y *Haemophilus somnus* se asocian con bronconeumonías fibrinonecrotizantes, (Tegtmeier *et. al.*, 1999).

Cuando se observan bronconeumonías crónicas caseosa y quizás necrosis coagulativa, se sospecha de *Mycoplasma bovis* con infecciones persistentes poco sensibles a muchos antibióticos (Caswell and Archambaul, 2008) y microscópicamente se pueden clasificar neumonías linfoproliferativas.

1.6 Generalidades del género *Mycoplasma* sp.

Al ser microorganismos carentes de pared celular, el uso de antibióticos como los betalactámicos en los tratamientos es ineficaz, presentan una morfología colonial característica de huevo frito, y pueden ser filtrables por membranas de 0.45 µm, se encuentran distribuidos en la naturaleza, desde el reino vegetal y animal.

Se postula que tienen especificidad de especie, por causar enfermedad únicamente en huéspedes específicos.

1.6.1 Cultivo *in vitro*.

El cultivo de micoplasmas *in vitro*, requiere de medios de cultivo, clasificados por su utilidad diagnóstica como medios de enriquecimiento, que contengan sueros sanguíneos, los cuales les proporcionan lipoproteínas y esteroides; mayormente, adicionados con extracto de levadura, una fuente de energía (habitualmente, glucosa), ácidos nucleicos y vitaminas. La adición de un indicador de pH como el rojo de fenol, facilita la identificación de los procesos metabólicos que realiza la especie aislada. En el medio sólido se observa la morfología típica de “huevo frito” y se requiere incubar de 48 a 72 horas a 37° C, en una atmósfera con el 5 al 10% de CO₂, y humedad del 80% (Howard, *et. al.*, 1994). Se deben realizar al menos hasta cuatro pases ciegos, por lo que puede demorar varios días.

1.6.2 Identificación del género.

La identificación del género *Mycoplasma* se puede realizar mediante el aislamiento de la bacteria, para después someterla a pruebas que permitan su identificación como:

- a) Morfología.- Se buscan colonias típicas del género, en forma de “huevo frito” en medio sólido, con ayuda de un microscopio estereoscópico.
- b) Filtrabilidad por 0.45 μm .- Los micoplasmas miden de 0.30 a 0.20 μm , por lo que pueden atravesar fácilmente membranas de filtración con tamaño de poro con diámetros similares.
- c) No reversión de formas L.- En esta prueba, se comprueba que después de quitar el agente inductor, en este caso la penicilina presente en el medio de cultivo, las bacterias aisladas sigan conservando la morfología típica de los micoplasmas, descartando que se tratase de formas L
- d) Sensibilidad a la digitonina.- El género *Mycoplasma* a diferencia del género *Acholeplasma* es dependiente de los esteroides presentes en el medio de cultivo. La prueba consiste en poner discos empapados con etanol de digitonina al 1.5%, sembrando del cultivo con crecimiento bacteriano, en el medio de cultivo sólido, incubando a 37°C por 24-72 horas y una vez crecida la bacteria se mide el diámetro de crecimiento con respecto al disco empapado de digitonina, el rango va de 4-5 mm para las colonias aisladas que se consideran positivas al género *Mycoplasma* (Chapman and Hall 1980) (Howard *et. al.* 1994).

Puede realizarse además la tipificación molecular mediante el empleo de técnicas como RFLP y PCR, que han sido ampliamente adoptadas en los laboratorios de

investigación y de diagnóstico, por la rapidez de detección de la especie involucrada, además de su elevada especificidad y sensibilidad mostrada, por lo que son más socorridas en la actualidad.

1.6.3 Características estructurales

Al carecer de la pared celular, los micoplasmas cuentan únicamente con la membrana plasmática, en ellas las proteínas constituyen dos tercios de la misma, donde los lípidos cubren el resto, el gran número de lipoproteínas puede atribuirse a la falta del espacio periplásmico. Las lipoproteínas de membrana se mencionan como los antígenos más dominantes, con una tasa elevada de variación antigénica.

En los Mollicutes para llevar a cabo el transporte de moléculas, se utiliza una proteína que funge como péptido señal, favoreciendo el contacto directo con la célula huésped, ya que esta clase no tiene pared celular, por lo que al fusión de las dos membranas, permite la transferencia o intercambio de los componentes con la célula huésped (Razin, *et. al.*, 1998)

1.6.4 Características Metabólicas

Los Mollicutes se pueden dividir en dos grupos, los fermentadores y los no fermentadores, los fermentadores producen ácidos a partir de hidratos de carbono, disminuyendo el pH del medio de cultivo. En estos organismos la vía de pentosa fosfato es incompleta, generando piruvato por glucólisis, pudiendo ser

metabolizado adicionalmente ya sea a lactato por la lactato deshidrogenasa o en acetil coenzima A por la vía de la piruvato deshidrogenasa.

En contraparte los no fermentadores y algunos fermentativos poseen la vía de arginina dihidrolasa, la hidrolisis de la arginina por esta vía resulta en la producción de ornitina, ATP, CO² y el amoníaco, con la consecuente elevación del pH del medio de cultivo. (Razin *et. al.*, 1998)

1.6.5 Características Moleculares

El genoma de los Mollicutes va de 600 a 2 200 Kb y en los micoplasmas de 580 a 1 380 Kb, en estos, la conformación genómica de nucleotidos se caracteriza por el bajo contenido de Guanina y Citosina, cuyo cantidad va de 24 al 33 mol% y al igual que otras procariotas, la adenina y citosina pueden contener residuos metilados, en muchos micoplasmas los residuos de adenina en la GATC se encuentra metilados y en otros casos puede encontrarse metilada la citosina (Razin *et. al.*, 1998)

1.6.6 Propiedades de patogenicidad.

Los micoplasmas poseen diversas propiedades o características, tanto estructurales como metabólicas y genéticas, que les permiten proliferar y sobrevivir en el huésped, como son: la presencia de cápsula, adhesinas, variabilidad de fase, biopelículas, enzimas, presencia de superantígenos y toxinas entre otros factores. (Razin *et. al.*, 1998)

1.6.6.1 Adhesinas

Muchas bacterias expresan estructuras de superficie que interactúan con el plasminógeno del huésped, que es una glicoproteína precursora de la plasmina. Diversos patógenos expresan estructuras de superficie que les permiten interactuar con el plasminógeno, y ejercer su actividad proteolítica. Las bacterias se recubren de plasmina, favoreciendo su adhesión e invasión a las células epiteliales (Lottenberg, 1997).

Recientemente la proteína α -enolasa altamente conservada en las procariotas, se ha encontrado en gran variedad de bacterias y se le relaciona además con la adherencia a la célula huésped, misma que se ha encontrado en *M. bovis*, señalando su posible participación en la adhesión de este microorganismo (Zhiqiang, *et. al.*, 2012).

Estudios realizados con *M. bovis* revelan que las proteínas de membrana influyen en su morfología, división celular, motilidad y adherencia a las células huésped, por lo cual se encuentran íntimamente involucradas en la patogénesis (James, *et. al.*, 2013). La simplicidad estructural de los micoplasmas, favorece el que estos microorganismos sean tomados como modelo de estudio, sin embargo, la compleja relación entre huésped-patógeno, y la flexibilidad genómica son es factor importante para establecer la cronicidad de infección, ya que esta capacidad le permite generar antígenos de superficie altamente variables (Bailao *et. al.*, 2007) (Buchenau *et. al.*, 2010) (Lysnyansky *et. al.* 1999). Se postula que en los micoplasmas, su alta patogenicidad es dependiente de las proteínas de superficie.

Siendo además la membrana y proteínas asociadas a la misma, un importante factor en la proporción de nutrición a la célula para su crecimiento y función.

Las citoadhesinas, en algunas especies también tienen un papel en la motilidad (Browning *et al.*, 2011) y claramente contribuyen a la virulencia, (Indikova *et al.*, 2013 y Tseng *et al.*, 2013) por ejemplo en *Mycoplasma genitalium* se requiere la expresión de las citoadhesinas P140 y P110 para el desarrollo de un orgánulo adjunto (Pich *et al.*, 2006). Otras proteínas de relevancia asociadas a la membrana citoplasmática de los micoplasmas, son las lipoproteínas, que actúan como citoadhesinas mediante sus componentes hidrofílicos, en tanto que, sus grupos acilo o hidrofóbicos sirve como anclaje a la membrana (Washburn *et al.*, 2003) y (Schmidt *et al.*, 2004)

Otro ejemplo de estas proteínas, es la proteína P48, encontrada en *M. bovis* y *M. agalactiae*, se piensa además que la especificidad de especie, puede estar dada por la presencia de receptores para estas proteínas en ciertas células huésped, ya que llegan a presentar pequeñas mutaciones según la especie de micoplasmas, por la homología que presentan entre las especies (Thomas *et al.*, 2005)

Los genes que codifican muchas de las lipoproteínas parecen estar dentro de los operones que codifican el casete de unión a ATP (ABC) transportadores y sus productos se cree que están asociados con el transporte de los nutrientes en la célula. (Li *et al.*, 2011) (Wise *et al.*, 2006) y (Qi *et al.*, 2012)

Se sugieren además que mutaciones en estos genes reducen la invasividad de micoplasmas, un ejemplo de esto se encontró en *Mycoplasma hyorhinis*, en la proteína transporte perteneciente a la superfamilia ABC caracterizada con 37 KDa

que influye en la invasividad de tumores *in vitro*, también se ha postulado comprobado con mutaciones realizadas al gen P100 gene y oppBCDF de esta especie de *Mycoplasma*. (Henrich, *et. al.*, 1999)

1.6.6.2 Cápsula

La cápsula es un factor en las bacterias, que ayuda en la colonización evasión de la respuesta inmune, en el huésped, algunas especies de micoplasmas presentan cápsula, tal es caso de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC, la cual está compuesta de galactano, ésta promueve lesiones y prolonga la infección en los bovinos, por otra parte la presencia de cápsula en *M. hyopneumonie* y *M. gallisepticum* tienen correlación con el incremento de la virulencia, además de que la adhesión a la célula huésped ha sido bien demostrada.

En *M. dispar* se postuló la producción de cápsula durante las infecciones naturales. Almeida and Rosenbusch (1991) realizaron un estudio al respecto, donde mostraron que *M. dispar* produce un material externo tipo cápsula en la infección, pero que al parecer éste es producido también *in vitro*.

1.6.6.3 Biopelícula

La formación de biopelícula por parte de las bacterias en general se considera de gran importancia para la sobrevivencia. La biopelícula se caracteriza por la formación de una matriz de polisacárido, que rodea a la bacteria una vez que está se adhiere a una superficie. En el caso de los micoplasmas un estudio realizado por McAuliffe, *et. al*, 2007, donde se expuso a *M. mycoides* subsp. *mycoides* a

diversos factores, como calor, choque osmótico y estrés oxidativo se demostró que este microorganismo persistió hasta por 20 semanas en fase estacionaria, se observó además que diversas cepas de esta especie tienen variaciones significativas en la capacidad de formación de biopelícula, así como en su morfología, ya que algunas cepas fueron incapaces de producir microcolonias, el análisis arrojó también la presencia de un gran número de proteínas ligadas a la adhesión en comparación con las células planctónicas.

1.6.6.4 Variabilidad antigénica y de fase

La variabilidad de fase comprende una conversión génica, efectuada por genes que codifican para proteínas de superficie, las cuales dan origen a distintas variantes, que pueden encenderse o apagarse según las condiciones medio ambientales pudiendo sufrir mutaciones. El cambio en las proteínas, puede ser respecto a su estructura, con la consecuente variación antigénica, que es utilizada por la bacteria como un mecanismo de evasión a la respuesta inmune, haciendo por esto complicada la vacunación en los organismos que presentan dicha característica.

Dentro del mecanismo funcional de la variabilidad de fase se piensa que las Repeticiones de Secuencias Simples (SSR) producen un cambio ON/OFF (encendido y apagado) que la desencadenan, resultando en la expresión de un conjunto de moléculas de superficie, ya que un cambio en el número de repeticiones en un segmento del DNA puede alterar la fase de lectura tradicional. Los SSR, se encuentra acomodados en tándem en las bacterias y que tienen

interacción con nucleótidos o pequeños nucleótidos del DNA y aunque son comunes en eucariotas, en procariotas son raras (Field and Wills 1998) (Mrázek *et. al.*, 2007). Estas secuencias se encuentran sujetas a mutaciones slipped-strand, siendo hipermutables según su longitud (Kashi and King 2006) (To'th *et. al.*, 2000), sin embargo, éstas secuencias pueden encontrarse en sitios codificantes de proteínas y sus mutaciones pueden causar desplazamientos del marco abierto de lectura y desactivación, además de la activación e inactivación de los genes, pues al encontrarse cercanas a pseudogenes, se piensa que estas pueden fungir como reguladoras ON/OFF, en la expresión de los genes viéndose reflejado en las proteínas de superficie en este caso; los SSR pueden encontrarse también en regiones reguladoras alterando la actividad de los promotores (Groisman and Casadesus 2005) (Karlin *et. al.*, 1996) (Moxon *et. al.*, 1994) (Rocha and Blanchard 2002)

Los SSR en *Mycoplasma* pueden llevar a cabo además roles fisiológicos y no limitarse únicamente a variabilidad de fase, por lo que se puede pensar en la organización del cromosoma y la influencia en las estructuras proteicas, así como la función de la célula (Mrázek, 2006)

En *M. capricolum* y *M. mycoides* los SSR están asociados a genes transportadores de ABC, que pueden ser reconocidos como antígeno al transportar proteínas de superficie como lipoproteínas (Blanchard *et. al.*, 1996) (Subramaniam *et. al.*, 2000), en el caso de *M. pulmonis* se asocia con metilasas del DNA contribuyendo con esto indirectamente en la variación antigénica (Rocha

and Blanchard 2002). Al respecto Xiangxue Guo & Jan Mrazek, 2008 realizaron una investigación, cuyo objetivo era ver la relación de los SSR a nivel genómico y fisiológico, se vio entonces la asociación de estas secuencias con genes tipo housekeeping, como RNAr y RNAt, además de amino acil-RNAt sintetasa, chaperones y en la codificación de algunas enzimas metabólicas, encontrando además que mutaciones en estos pueden inducir mutaciones letales.

En *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC se encontró que al presentar variabilidad antigénica y variabilidad de fase, la proteína Vmm producida por el gen *vmm*, presenta un cambio estructural, lo cual ocurre cuando existe una inserción o delección de un dinucleótido en la región repetida del promotor, mismo que es activado con TTGACA-35 pb y TATAAT-10 cuya región se encuentra separada por 17 pb reconocido por el factor sigma en procariontes, al efectuarse esta delección o inserción en este espacio, se produce cambios en el promotor, afectando el reconocimiento y unión con el factor sigma (Persson *et. al.*, 2002).

1.6.6.5 Plásmidos

El paso de material genético de una bacteria a otra ha sido primordial para la evolución y subsistencia de las mismas, contribuyendo a la adquisición de características favorables para la colonización. En los micoplasmas se conocen cinco plásmidos aislados de algunas especies pertenecientes al grupo filogenético *Spiroplasma*, cuatro de estos pertenecen a la especie *M. mycoides* (pADB201, pKMK1 y PMMC-95010) de la subespecie *capri* (MMC). Según Bretón *et. al.*,

2012, en un estudio genético se encontraron que varias especies de micoplasmas de rumiantes, contienen plásmidos miembros de una familia, que pueden replicarse en forma de círculo rodante, todos estos comparten genética, tamaño y organización similar, en el caso de *M. yeattsii*, se encontró uno de mayor tamaño y se cree que es móvil, al encontrar evidencia de la aparición de recombinantes genéticas se sugiere que son compartidos entre micoplasmas con nichos similares.

1.6.6.6 Toxinas

En las bacterias algunas toxinas sirven para la unión a las células huésped y ayudan a la colonización, además de producir la enfermedad. Los micoplasma también producen toxinas, se encontró en *M. pneumoniae* una proteína con un peso molecular de 68 KDa, que demuestra alta afinidad de unión a proteína surfactante-A humana, esta proteína cuenta además con una serie de propiedades que producen un proceso inflamatorio, además de citopatologías incluyendo ciliostasis, pérdida de la integridad del tejido y la lesión, así como la muerte celular, sin embargo, el proceso por el cual está proteína llamada CARDS entra en las células diana es aún desconocido (Johnson, *et. al.*, 2011).

1.6.6.7 Sistemas de transporte

Los sistemas de transporte tienen como objetivo el paso de moléculas del interior al exterior de la célula y viceversa, en los micoplasmas se cuenta con transportadores ABC (Wise *et. al.*, 2011) (Qi *et. al.*, 2012)

1.7 Los Micoplasmas en el CRB

En 1992, en el Reino Unido, se identificaron a partir de los micoplasmas aislados de la cavidad nasal, *M. bovirhinis* (88%), *M. bovis* (20%), *M. bovigenitalium* (4%), *M. arginini* (16%) y *M. canis* (12%) (Laak, *et. al.*, 1992). En estudios realizados en Europa, *M. bovirhinis*, fue aislado mayormente de cavidad nasal en los bovinos (Hirose, *et. al.*, 2003), y en menor frecuencia de neumonías, sin embargo, es considerado por algunos autores como microbiota de la cavidad nasal de los bovinos (Angen, *et. al.*, 2009).

1.7.1 Especies de micoplasmas más frecuentes en el CRB

En los estudios reportados se menciona a *M. bovis* como la especie más frecuentemente aislada, además de ser el causante de lesiones pulmonares así como de signos clínicos de importancia, seguido de *M. dispar*, *M. bovirhinis* quienes han sido identificados partir de lavados endotraqueales e hisopados nasales (Laak, *et. al.*, 1992), (Hirose, *et. al.*, 2003) y (Angen, *et. al.*, 2009) de animales con signología de enfermedad respiratoria y en estudios realizados en nuestro país también se ha identificado aunque en menor frecuencia, en comparación a las otras especies de micoplasmas a *Mycoplasma mycoides* (Rojas, 2013) de hatos lecheros.

1.7.2 *Mycoplasma bovis*

Este microorganismo es considerado de diagnóstico difícil, persistente en los hatos y de rápida transmisión, incrementado por una antibioterapia inadecuada en la población de ganado (Caswell and Archambault, 2007), se considera como causante de mastitis, otitis, artritis y neumonías, en las cuales a la necropsia se observan áreas de consolidación, con zonas de necrosis (Prysliak *et. al.* 2011), (Hermeyer, *et. al.*, 2012). *M. bovis* puede persistir en las lesiones pulmonares necróticas, y dentro del lumen bronquial que contiene exudados, con lo que se hipotetiza la capacidad que presenta el microorganismo para evadir la fagocitosis (Kleinschmidt *et. al.*, 2013)

1.7.3 *Mycoplasma dispar*

En un estudio realizado en el 2000 por Tegtmeyer *et. al.*, se desafiaron terneras con *M. dispar* con aerosoles, sin embargo, no se encontraron lesiones relacionadas con neumonía a la necropsia, por otro lado se reportó por Gourlay *et. al.*, 1970 el hallazgo de lesiones neumónicas, donde histológicamente en algunas fue encontrada una respuesta proliferativa, causando lesiones más severas en animales gnobióticos, sin embargo, Gourlay, 1982 y Pirie y Allan, 1975 refieren que el aislamiento de *M. dispar* se da mayormente en animales adultos que en jóvenes, por lo que en adultos pueden observarse lesiones neumónicas y en jóvenes es frecuente únicamente observar inmunosupresión, la respuesta inmunológica encontrada por *M. dispar* es mediada por IgG1 y las IgA (Howard 1994), Thomas and Parsons, 1987)

1.7.4 *Mycoplasma bovirhinis*

Se ha reportado su asilamiento en ganado con problemas respiratorios así como en animales sanos, a menudo asociado con *M. bovis* e incluso siendo aislado con mayor frecuencia que *M. bovis* en animales enfermos (Thomas *et. al.*, 2002)

1.8 Situación del CRB en el mundo

Esta enfermedad se encuentra ampliamente distribuida en el mundo, dada la participación de virus y bacterias puede considerarse la implementación de vacunas en la enfermedad.

En lo correspondiente a las bacterias de *Mannheimia* sp., así como las especies de *Pasteurella* sp y *Mycoplasma* sp., se encuentran distribuidas según la zona geográfica, entre los micoplasmas, las más reportadas en base a su frecuencia son *M. bovis*, *M. dispar* y *M. bovirhinis*.

En los estudios llevados a cabo en Canadá donde se trabaja mayormente con ganado para abasto de carne, se reporta en su mayoría la presencia de virus y micoplasmas, por tanto su enfoque va más hacia los sinergismos entre los virus y *M. bovis*, que es la especie mayormente reportada en el CRB (Pryslak, *et. al.*, 2011).

1.8.1 Virus

Los virus que se han reportan en el CRB son IBR, BHV-1, PIV-3, BAV-7, BRSV de estudios realizados en Europa desde serologías, hasta el aislamiento de los agentes (Härtel, *et. al.*, 2004) (Kirchhoff, *et. al.*, 2014) (Angen, *et. al.*, 2008) (Orro, *et. al.*, 2011)

1.8.2 Bacterias

En el caso de las bacterias se han identificado a *Histophilus somni*, *Pasteurella multocida*, (Härtel, *et. al.*, 2004) *Mannheimia haemolytica*, *Truperella pyogenes* (Surveillance report, Northern Ireland, 2013), *Mannheimia glucosida* (Angen, *et. al.*, 2008) (Orro, *et. al.*, 2011)

Aunque en un gran número de artículos se postula que los virus son los primeros agentes en actuar en el CRB, sirviendo cómo un iniciador de la enfermedad al deprimir inmunológicamente al animal, se ha logrado demostrar en otros trabajos experimentales que las bacterias por sí mismas, pueden causar también un cuadro desde febril a neumónico. Lo cual ha despertado el interés en el estudio las bacterias involucradas en el CRB, sin embargo, se sigue reportando más de un agente etiológico involucrado en la enfermedad. (Booker, *et. al.*, 2008)(Yates, *et. al.*, 1982)

1.9 Situación del CRB en México

En México se han realizado estudios sobre las bacterias y virus participantes en el CRB, con la presencia de *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* serotipos A y D (Blanco, 1990), en cuanto a los estudios serológicos Jaramillo 2007 indicó a los serotipos A1 (2.3%), A6 y A3 (50.1%). *M. bovis* 39.7%, *M. dispar* 24.8% y *M. mycoides subsp capri* 15.6% (Rojas 2013).

En los virus se reportan IBR, BHV- 1, PIV-3 (Juárez 2001), (Fernández, 1980), DVB (Ruiz 2010), indicando seroprevalencias de: IBR 18.77%, DVB 22.27%, VRSB 83.33% y PI-3 58.33% en el Valle del Mezquital Hgo., donde las seroprevalencias se encontraron a lo largo de la etapa productiva de los bovinos, (Sánchez 2010).

1.10 La importancia del CRB en las unidades de producción

En la micoplasmosis, se observan los primeros signos clínicos a partir de las dos semanas en animales que previamente tuvieron contacto con animales enfermos (Adegboye *et. al.*, 1996). En los bovinos destinados a producción de leche, la enfermedad respiratoria ocasiona pérdidas por la baja productividad, costo de tratamientos e incluso por la muerte de los animales. La importancia de los micoplasmas dentro del CRB, se ha reportado ampliamente. En Dinamarca por ejemplo, Angen *et. al.*, 2008 reportaron 87% positivos a *Mycoplasma* sp., de aspirados transtraqueales a partir de una población de animales clínicamente sanos y con signología de neumonía.

Además de la identificación molecular, por aislamiento y bioquímica se han realizado otros estudios para la identificación de los micoplasmas. En Irlanda del Norte en el 2013, a partir de los hallazgos a la necropsia en 111 bovinos se reportó a *M. bovis* en 36 casos (32.4%) y Härtel y *et. al.*, 2004 en Finlandia, llevaron a cabo un estudio serológico mediante la técnica de ELISA, encontrando el 93% de las muestras como positivas a *Mycoplasma* sp.

El CRB tiene un gran impacto en las explotaciones zootécnicas, Griffin en 1997 realizó un estudio del impacto económico asociado a las enfermedades respiratorias en ganado destinado para abasto de carne, en dicho artículo calculó que el costo de animales enfermos, equivalía aproximadamente al 7% del costo total, en las secuelas por CRB reportó un costo de US\$10.53 vaca/año y US\$14.71 becerro/año. Snowden, *et. al.*, 2008 indicó en su estudio que la variación de ganancia de peso de animales sanos y con enfermedad respiratoria resultó ser estadísticamente significativo, sin embargo, en el calculo debe de tomarse en cuenta la incidencia de la enfermedad en el hato, así como factores genéticos, medioambientales, etc.

Los costos que tiene el CRB en México no ha sido analizado, sin embargo, un estudio realizado en becerras lecheras en Tijuana, Baja California en el 2003 determinó la incidencia y costos de enfermedades neumónicas, donde las pérdidas fueron calculadas en base a costos directos, perdidas por mortalidad, tratamientos, mano de obra, vacunas, entre otros. La incidencia de las enfermedades respiratorias en dos establos fueron del 39.9% y 19.7% y los costos

directos e indirectos por becerro variaron entre \$301.7 y \$505.41 y \$83.25% y \$235.12 respectivamente.

JUSTIFICACIÓN.

El aislamiento de los micoplasmas requiere de varios días, dificultando la identificación oportuna de la micoplasmosis en los bovinos, por lo que se hace necesario recurrir a técnicas moleculares rápidas, específicas y sensibles como la PCR multiplex para una identificación de los micoplasmas involucrados en el Complejo Respiratorio Bovino en la zona centro del país.

Objetivo general:

Estandarización de la PCR multiplex con cepas tipo: *M. bovis*, *M. dispar* y *M. bovirhinis* y su validación con muestras de hisopos nasales de bovinos, provenientes de unidades de producción láctea con y sin antecedentes de enfermedad respiratoria, con el fin de identificar las especies de micoplasmas asociadas en el Complejo Respiratorio Bovino.

Objetivos específicos:

- Colectar de los hisopos nasales de bovinos con y sin antecedentes respiratorios, en zona centro de México.
- Procesar los hisopos nasales para el aislamiento del género *Mycoplasma* sp. con el medio de Hayflick
- Extraer el ADN, de las cepas de micoplasmas aisladas, de los hisopos nasales y las cepas tipo de *M. bovis*, *M. dispar* y *M. bovirhinis*, con el protocolo de Tiocianato de Guanidina.
- Detectar de los hisopos y de los aislados, al género *Mycoplasma* sp. mediante la PCR RNAr 16S
- Diseñar iniciadores específicos para la identificación de *M. bovirhinis*.
- Estandarizar la PCR multiplex con cepas tipo de *M. bovis*, *M. dispar* y *M. bovirhinis*.
- Identificar a *Mycoplasma* sp. del grupo *mycoides* asociado a problemas respiratorios mediante la PCR punto final.
- Validar la PCR multiplex, con muestras de campo de hisopos nasales de bovinos con y sin antecedentes de enfermedad respiratoria.

HIPÓTESIS

Con la estandarización de las PCR multiplex, se eficientará la tipificación de *M. bovis*, *M. bovirhinis* y *M. dispar* implicados en el CRB y según trabajos anteriores, será capaz de detectar en un 20% a estas especies, a partir de hisopos nasales de bovinos con antecedentes de enfermedad respiratoria, observando una mayor frecuencia de *M. bovis*.

2. MATERIAL Y MÉTODOS.

2.1 ZONA DE ESTUDIO.

Se realizaron muestreos en cinco unidades de producción láctea (UPL) del centro del país: Aguascalientes (1), Hidalgo (2), Guanajuato (1) y Puebla (1).

2.1.1 Grupos de estudio.

Se colectaron hisopados nasales de bovinos de 0 a 1 año de edad, en unidades de producción con y sin antecedentes de enfermedad respiratoria.

2.1.2 Cálculo del tamaño de muestra.

$$n = Z^2 p \cdot q / d^2$$

n= número de muestra

Z= grado de confianza para rechazar H_0 cuando es cierta (α) 95%

d= margen de error del 5%

p= frecuencia de éxito

$$q = 1 - p$$

$$n = 1.96^2 (0.32)(0.68) / (0.05)^2$$

$$n = 3.8416 (0.2176) / 0.0025 = 334.37 \sim 335$$

2.1.3 Colección de muestras

Las muestras fueron colectadas de la mucosa nasal de bovinos empleando hisopos de plástico estériles, efectuando movimientos circulares y arrastre durante la toma, los hisopados se introdujeron en tubos conteniendo medio de cultivo Hayflick modificado por Miranda en 1999, y se transportaron a temperatura de refrigeración (4°C) hasta su procesamiento en el laboratorio.

2.1.4 Muestras colectadas.

El número de hisopos nasales colectados en las distintas zonas de estudio se muestra en el cuadro 1.

Cuadro 1. Muestras de hisopos nasales colectadas de bovinos con y sin antecedentes respiratorios de las distintas zonas de estudio.	
Lugar de procedencia	TOTAL
✓ Tizayuca Hgo.	100
o Ixmiquilpan Hgo.	30
✓ Aguascalientes	94
o Guanajuato	84
o Puebla	27
TOTAL	335

✓ Lugares con antecedentes respiratorios
o Lugares sin antecedentes respiratorios

2.2 PROCESAMIENTO DE LOS HISOPADOS NASALES PARA EL AISLAMIENTO DE MICOPLASMAS.

Las muestras de hisopados nasales, mantenidos a 4°C, fueron atemperadas e incubadas¹ de 8 a 12 horas a la temperatura de 37 °C. Las muestras que presentaron contaminación bacteriana después de la incubación fueron filtradas por membrana de 0.45 µm (Howard, *et. al.*, 1994).

Para el aislamiento bacteriano se siguió la metodología de Tully *et. al.*, 1983, se depositaron 200 µl del medio de cultivo de la muestra en un volumen de 1.8 ml de medio nuevo de Hayflick, asimismo se tomaron 30 µl de la muestra y se inoculó en el medio de Hayflick sólido. Del tubo inoculado con los 200 µl se realizaron diluciones decuples seriadas hasta 10⁻³ en medio de Hayflick y se incubaron a 37°C en aerobiosis, el medio sólido fue incubado a 37°C en velobiosis con una humedad del 80%. Las diluciones y las placas fueron revisadas de 24 a 48 horas, buscando en el medio sólido la morfología colonial típica de “huevo frito” con ayuda de un microscopio estereoscópico. En las diluciones observando un cambio de pH, en caso de presentarlo, las muestras se sembraron nuevamente en medio Hayflick sólido con la finalidad de encontrar morfología sugerente a micoplasmas, a la vez se resembró en medio líquido, para permitir la replicación bacteriana. En el caso de que en una muestra no hubiera cambio de pH, ni morfología sugerente se realizaron pases del medio líquido y sólido cada siete días, hasta un total de cuatro pases ciegos para descartar que la muestra fuera positiva al aislamiento de micoplasmas. (Tully, *et. al.*, 1983) y (Howard, *et. al.*, 1994)

1. Incubadora Fisher Scientific

2.2.1 Determinación del género *Mycoplasma* sp de las cepas aisladas.

La identificación del género *Mycoplasma* sp. para los diferentes aislados se determinó por su morfología típica en el medio de cultivo sólido, filtración de los cultivos líquidos por membranas de 0.45 µm, comprobación de que no eran formas L y la prueba de digitonina^{R1} para determinación del género para todos los aislados (Tully *et. al.*, 1983 y Howard *et. al.*, 1994)

2.3 PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA PARA LA EXTRACCIÓN DE DNA

Para realizar la extracción del ADN, al medio de transporte que contenía el hisopado se le agregaron 30 ml de medio líquido Hayflick, manteniendo en incubación a 37°C por 72 horas. Posteriormente los 30 ml fueron centrifugados a 11,300 x g durante 45 min a 4 °C, una vez obtenido el concentrado o pellet se le adicionó PBS (7.2 pH) para realizar tres lavados, centrifugando nuevamente a 11,300 x g durante 45 min, de cada lavado se decantó el sobrenadante, los concentrados fueron conservados en tubos ependorff con 1ml de PBS en congelación a -20°C hasta su procesamiento para realizar la extracción de DNA. (Tully *et. al.*, 1983)

2.3.1 Crecimiento de las cepas aisladas.

Las colonias aisladas se crecieron en 20 ml de Hayflick, para posteriormente ser centrifugadas a 11 300 x g durante 45 min a 4 °C con la finalidad de obtener el concentrado, se lavó en tres ocasiones con PBS (7.2 pH), centrifugando a las mismas constantes entre cada lavado, a partir de lo cual se realizó la extracción de DNA (Tully *et. al.*, 1983)

2.3.2 Crecimiento de las cepas tipo.

Se tomaron aproximadamente de 1 a 1.5 ml de la cepa tipo contenida en el medio de Hayflick y se depositaron en 2 ml de medio Hayflick líquido y 30 µl en medio sólido de Hayflick, todo fue incubando por 24 horas a 37°C. En el caso de observar cambio de pH se le agregaron 10 ml de medio Hayflick, para permitir la replicación bacteriana, posteriormente se adicionaron 50 ml y finalmente 100 ml. En cada paso se realizó la prueba de esterilidad en agar sangre y se vio la viabilidad y pureza de la cepa inoculando en medio sólido. La cepa se centrifugó² a 11, 300 x g durante 45 minutos a 4°C para obtener el pellet y se procedieron a realizar los tres lavados con PBS (7.2 pH) (Tully *et. al.*, 1983, Howard *et. al.*, 1994)

2.3.3 Extracción de DNA.

- La extracción de DNA de los hisopos nasales, cepas aisladas de *Mycoplasma* sp. y cepas tipo de al género *Mycoplasma* sp. se realizó mediante el protocolo de Tiocianato de Guanidina ^{R2}, (Sambrook y Russell 2001) con el siguiente procedimiento:
 1. Descongelar y homogenizar la muestra.
 2. Centrifugar a 10 000 rpm durante 10 minutos y decantar el sobrenadante.
 3. Agregar al concentrado 200 µl de Tiocianato de Guanidina y homogenizar hasta por 10 minutos.
 4. Adicionar 100 µl de Acetato de Amonio (7.4M) y dejar en hielo por 10 minutos.
 5. Agregar 200 µl de Ácido Acohol Isoamilico y centrifugar por 5 minutos a 10 000 rpm
 6. Obtener el sobrenadante con ayuda de una micropipeta y desechar el resto.
 7. Colocar el sobrenadante en un tubo ependorff estéril y adicionar 750 µl de Etanol puro, mezclar y centrifugar nuevamente a 10 000 rpm por 5 minutos.
 8. Decantar el sobrenadante y agregar al pellet 1 ml de Etanol al 70%, centrifugar nuevamente a 10 000 rpm por 5 minutos y decantar el sobrenadante.

9. Dejar secar el tubo con la extracción de DNA a temperatura ambiente toda la noche.

10. Las extracciones de DNA fueron conservadas en congelación a -20°C.

2.4 PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DEL GÉNERO *Mycoplasma* SP. MEDIANTE LA PCR ARNr 16s

A las 335 muestras se les realizó la PCR ARNr 16s para el género *Mycoplasma* sp., suspendiendo el DNA de cada una de ellas en 30 µl de agua destilada estéril, con el fin de establecer un verdadero negativo de las muestras procesadas.

Los oligonucleótidos empleados fueron:

Fw **CTGGCTGTGTGCCTAATACATGC**
Rv **CTTCGGGCATTACCAGCTCC**

Reportados por Labee-Loun *et al.*, 2001, obtenidos de la secuencia AF340023, que se encuentra en el GeneBank. Las secuencias presentan una homología del 100% para el género *Mycoplasma* sp. con el programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) del *Nacional Center for Biotechnology Information* (NCBI)

***Mycoplasma canis* 16s RNA ribosomal gene, partial sequence**

GenBank: AF340023.1

ORIGIN

```
1 acgctggctg tgtgcctaat acatgc atgt cgagcggagt tcttcggaac ttagcggcga
61 atgggtgagt aacacgtact taacatgcct ttagattgg gacaacgatg agaaattatc
121 gctaataccg gatacttata tggttcgc at gaactatata taaaagaagc ctttaaagct
181 tcactaaaag attggggtgc ggaacattag ctagttggta aggtaatggc ttaccaaggc
241 gatgatgttt agcgggggtg agagactgat ccgccacact gggactgaga tacggcccag
301 actcctacgg gaggcagcag tagggaattt tccacaatgg acgaaagtct gatggagcga
361 cacagcgtgc aggatgaagg ccttcgggtt gtaaactgct gttataaggg aagaaaaagc
421 agtagaggaa atgctattgc cttgacggta cttgtcaga aagcaacggc taactatgtg
```

481 ccagcagccg cggtaataca taggttgcaa gcgttatccg gaattattgg gcgtaaagcg
 541 tctgtaggtt gtatgttaag tctggcgtga aaacttgggg ctcaacccca aattgcgttg
 601 gatactggca tgctagaatt gtgtagaggt tagcgggaatt cctagtgaag cggtgaaatg
 661 cgtagatatt aggaagaaca tcaacatggc gaaggcagct aactgggcac atattgacac
 721 tgagagacga aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc acgctgtaaa
 781 cgatgatgat tagctgatag taraactatc ggacacagcta acgcattaaa tcatccgcct
 841 gagtagtatg ctcgcaagag tgaaacttaa aggaattgac ggggatccgc acaagcggtg
 901 gagcatgtgg tttaatttga agatackcgt agaacccttac ccaactcttga catcttccgc
 961 aaagctatag agatatagtg gaggctaacg gaatgacaga tggatgcattg ttgtcgtcag
 1021 ctcgtgtcgt gagatgttcg gttaagtcct gcaacgagcg caacccttgt ccttagttaa
 1081 ttttctaggg agactgcccg agtaattggg aggaagggtg ggacgacgtc aaatcatcat
 1141 gcctcttacg agtggggcaa cacacgtgct acaatggatg gtacaaagag aagcaaaacg
 1201 gcgacgtcaa gcaaatctca aaaaaccatt ctcagttcgg attgtagtct gcaactcgac
 1261 tacatgaagt cggaatcgct agtaatcgta gatcagctac gctacggtga atacgttctc
 1321 gggctcttga cacaccgccc gtcacaccat **gggagctggg aatgcccga** gtcgggtttg
 1381 ttaactacgg agacaactgc ctaaggcagg gccggtgact ggggtgaagt cgtaacaagg
 1441 taaca

//

2.4.1 Reacción para la PCR RNAr 16s

La mezcla de reacción para la PCR RNAr 16s, se muestra en el cuadro 2.

Cuadro 2.- Cantidades y reactivos utilizados para PCR RNAr 16s

Reactivo	Cantidad
Buffer 10x	2.5 µl
MgCl 50 Mm	1.75 µl
Dntp's 10 mM	1 µl
Fw 20 pmol	1µl
Rv 20 pmol	1µl
DNA	5 µl
Agua	12.5 µl
Taq	0.25 µl
TOTAL	25 µl

2.4.2 Amplificación del fragmento RNAr 16s

La amplificación del ADN se realizó con los siguientes tiempos:



El resultado se visualizó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio^{R3}. El producto esperado fue de 1,370 pb, mismo que fue apreciado con ayuda del marcador 1kb Ladder (Invitrogen), teniendo como control positivo a *M. bovis* (cepa Donnetta) y como controles negativos cepas de campo de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida*

2.5 ESTANDARIZACIÓN DE LA PCR MULTIPLEX.

Para la estandarización de la prueba se utilizaron las cepas tipo de *M. bovis* (cepa Donetta), *M. dispar* (ATCC 27140) y *M. bovirhinis* (ATCC 27748). El DNA de cada una de ellas se suspendió en 100 µl de agua destilada estéril y se utilizaron las cepas ATCC de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* como controles negativos.

Los iniciadores empleados para *M. bovis* en la estandarización de la PCR multiplex fueron los reportados por Hotzel, Sachse, Pfützner en 1996; para *M. dispar* se emplearon los iniciadores descritos por Rojas en 2013, mientras que, los iniciadores para *M. bovirhinis* se diseñaron a partir de una secuencia del GenBank: FJ765326.1 del gen *rpoB*, las características se verificaron con el programa *Integrated DNA Technologies* (IDT).

Los oligonucleótidos para *M. bovis* reportados, fueron modificados en cuanto a su porcentaje de Guanina y Citosina para adecuarlos a TM (temperatura media) aproximada de 55°C, los cebadores utilizados para la PCR multiplex se muestran en el cuadro 3

Cuadro 3.-Descripción de los iniciadores utilizados en la PCR multiplex

<i>Mycoplasma</i>	FW 5'-3'	TM *	RV 5'-3'	TM *	Producto esperado
<i>M. bovis</i>	GCTCTTTTGAAC AAATACGTCAA GAG	55°C	GGCTCTCAT TAAGAATGT CTTTGTCTAA	55°C	1907 pb
<i>M. dispar</i>	GAGTTACTTCT CTTGGTCCTGGA GGTC	59.7°C	GCGGGCAAT ATCAGATTCAA TTCC AGTTG	59.9°C	548 pb
<i>M. bovirhinis</i>	TGGATCAAATT AATCCATTATC AGAAGTTTC	54.3°C	GTT CCG TTAGTA TAA GTA T AGTTA CGA CG	54.6°C	397 pb

* TM= temperatura media de alineación, según análisis del programa IDT en línea Fw: Forward, Rv: Revers

Al utilizar el *Oligo analyzer 3.1* y el *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)* del NCBI los oligonucleótidos presentaron el 100% de homología para su especie correspondiente.

Secuencias utilizadas

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

```

1 aagcttcagt tttagctctt tttgaacaaa tacgtcaaga gtacaatata tcaataattt
61 taatttcgca taacattagt gttgtcgcta agttttgtga atatatttat gttatgtatg
121 ctggcaaaat tgttgaaaga ggaactagaa aagatatttt tactaatcca gtcaccctt
181 atacatgagc gcttatctcg gctatacctg aaaatgatga tgagagatta ttctcaattc
241 aaggaacccc accagatatg gcaaacttac ctatcggtga cccttttgca cctagaaatg
301 actttgcctt agaaattgac tatgaaaaag aaccaccatt aattgaaatt aatagtcac
361 ataaagcagc aacgtgacta cttcaccctg atgcaccaa aatacaaaga ccaaaagaat
421 tagaacatag actaaaaagt tttagaagg tatttaaaga cgatgaagaa taacgacaat
481 aaaaagtca ttttagaat tcaagatctt aaaaagtact ttttaataa cggtaaggtc
541 aacaaagctg ttgatggtgt gtcatttaa ttacatgaag gtgaaatagt cgggtctaatt
601 ggtgagtcag gaagtggaaa aaccactggt ggacgttcaa ttctaaggct ttatgacgat
R3. Research Organic : ttgttacttt agatgatcaa atcattagcg gagaaagcat ttctaaaaaa

```

```

721 cgcgaaaagt ttttgcgtaa aagagtgcaa atgatctttc aagatccaca cgcgtcttta
781 aacggccaaa aaactatcta tagcattctt aaagaacctt tagttgtcaa taacataatt
841 aagcaaaaaa ctgatgatct atttagtgc tgaaaaaaag 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 ttttaataatt ttctttcgga atataagaac
1381 gagatcaaaa tttgccgta tgcaagatta aatacttacg acatagattt ttactttttt
1441 aactataaaa aagagctaac caacaaaata aggttagatg taatcaaaaa atataagtct
1501 aagttaagtt atttatcaat agatcaaatt cgtaaattta ttgctgaatt aaacaaatat
1561 actaatagtt ttacattga 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 tcaaattaag caa ttagaca aagacattct taatgagagc
1921 c ttttatata aaaatttaaa aactcagcaa ggtattaatg atctcaagtt taaaaagatt
1981 aatgaagcgt tttttgaaaa gctt

```

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

```

1 ttaatcctct tggtgaaatg gcaaacaaaa gaaagagttac ttctcttggt cctgg aggtc
61 taaatcgtga taccgcccaa tttgaggttc gggatgtgca ctcaactcac tacggtcgaa
121 tttgtcctgt tgaaactcct gaaggacaaa acatcggttt aattcttaat ttttctgttt
181 tttcaaaaat caataaatac ggttttatta tcaccttta ttataaagta acaaatcgcg
241 ttgtcgattt taaacaagtt cattgactta cagccgcgga agaatacgga ctaagttttg
301 cccaatcttc aatcgaaatt gacaaaaaaa atagaattgt tgctgataaa ttaacagttc
361 gaaaaaatca aacttacctt gttcttgact cagaacaagt cgattatata gatgtttctt
421 caatgcaaat gacttcaatt tcagcatcag caattccttt tttggaaaat aacgatgcta
481 accgtgctgt tatgggttca aacatgcaac gtcaagcagt gccgcttatt aaatcagaag
541 caccgcttgt tgcaactgga attgaatctg atattgcccc cttttcagca accaatttac
601 gcgcaaccgt tagtggaaaa gtagtttttg tcgattcaaa aaaagtcatt attaacgatg
661 gcgaatcaca aaaaattcat tatttacgtg cttttgaaaa gtccaaccaa gaaacactaa
721 ttttcaaaaa accaacagtt aaagttgggtg atgttgtcaa aaaaggacaa ctaatttgcg

```

781 atggtccttc aactgacaac ggtgaacttg cccttggaag aaatgttctt gttgctttca
 841 gcacttgata tggttataat tacgaagatg ccatcatttt aagcgaaaag ctcgtaaaag
 901 acgatgtttt tacctcaatt cacattcagg aacaaactat taaattccgt tcttcaaaag
 961 caggaaacga tgttctaact gccgaagttc ctaatgcttc gacaaaatca cgcgcccatc
 1021 ttgatgctaa cggaatcgta atcgttggtt cagaagttga tactgggtgat attttagtcg
 1081 gaagaacatc gccaaaagga gaagataatc caaccgctga agaaaaatta atggcgccaa
 1141 tttggggtaa aaaagcactt gcacaaaag acacttcact tcgtgttaaa aatggtgaag
 1201 gcggaaccgt tatcgatgtt caaattcttt ctgcgatca aggtgacaat ctcgagaag
 1261 gtgtcggaat gcttggttaa atcttgatcg cccaaaaag aaagggttaa gttggcgaca
 1321 aaatggcagg tcggcacgga aataaagggtg ttgtttcgat agttcttcca gttgaagata
 1381 tgccgttttt agaagacgga actccggtg atgtcgtcct aaaccgcaa ggtgtgcctt
 1441 cgcggatgaa tatcggtaaa gttttagaat tgcaccttg aatggcagca aaaagattaa
 1501 atacaaaatt tgtcaccca gtttttgacg gaattaaaat tgatactatc aaaagtttgt
 1561 ttgccgaggc aaatattcct gaatcaggaa aattcaaatt atttgacgga attactggtc
 1621 aagcttttga gaatccagtt tctgttggtt atatgtatat gctgaaatta caacatatgg
 1681 ttgatgataa aatgcatgca agatcaatcg gaccttattc actaacaaca cagcaacctt
 1741 taggtggaag atcacaaaat ggtgggcaaa gattc

Mycoplasma bovirhinis strain ATCC 27748 RNA polymerase (rpoB) gene, partial cds
 GenBank: FJ765326.1

1 tccaa**tgatc aaattaatcc attatcagaa gttt**caaca aacgtcgtgt tactt
 61 cgtaggtcc aggagggtta agccgtgata ctgcacaatt tgaagttcgg gatgtgcatg
 121 caactcacta tggtagaatt tgtccaattg aaactcctga aggattaaac attggactta
 181 tcttaaaact tgcaacttat gcacaaatcg atgacaaagg gttcttaaaa accccttatt
 241 ataaagttaa taatggagta attgattata gtgatgtacg ttattttaa gcaactcaag
 301 aattaggata ttcaattgct caatcttcag ttaaagttga tgaaaataat aaaattattg
 361 atgataattt aacaattcgt **cgtaactata cttatactaa cggaac**aagt tcagaaattg
 421 actttgtcga agtttcttca aaacaaattt tatctgttgc tgcagctggt ataccattct
 481 tagaaaatga tgatgcaaat cgtgcactga tgggtccaac

Genes amplificados y productos:

- *M. bovis*: genes *oppD* y *oppF*, Proteínas relacionadas con la estructura del transporte de oligopéptido permeasa. Con un peso molecular de 1907 pb
- *M. dispar*: gen *rpoB*, codificante de la subunidad β de la ARN polimerasa. Con un peso molecular de la 548 pb.
- *M. bovirhinis*: gen *rpoB*, codificante de la subunidad β de la ARN polimerasa. Con un peso molecular de 401 pb.

2.5.1 Reacción para la PCR multiplex

La reacción empleada para la PCR multiplex se muestra en la cuadro 4.

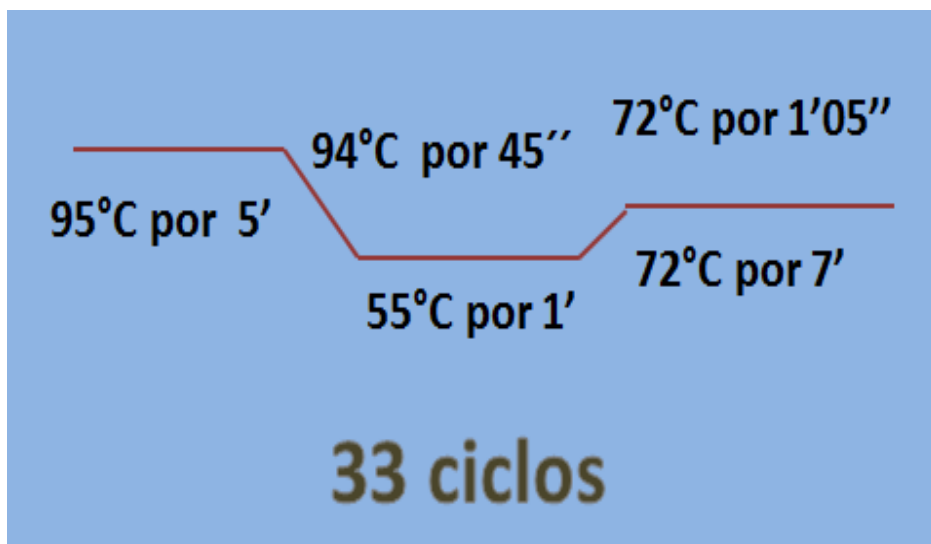
Cuadro 4.- Cantidades y reactivos utilizados en la mezcla para la PCR multiplex.

Reactivo	Cantidad
Buffer 10x	2.5 µl
MgCl 50 mM	1.75 µl
Dntp's 10 mM	1 µl
Fw <i>M. bovis</i> 20 pmol	1µl
Rv <i>M. bovis</i> 20 pmol	1µl
Fw <i>M. dispar</i> 20 pmol	1µl
Rv <i>M. dispar</i> 20 pmol	1µl
Fw <i>M. bovirhinis</i> 20 pmol	1µl
Rv <i>M. bovirhinis</i> 20 pmol	1µl
DNA	10 µl*
Agua	3.5 µl
Taq	0.25 µl
TOTAL	25 µl

* Mezcla de los tres DNAs

2.5.2 Amplificación de los fragmentos de la PCR multiplex

Los tiempos para la amplificación de los productos de la PCR multiplex, fueron:



Para la visualización de los resultados, los productos de la PCR fueron corridos a 80 volts, 500 MAP por 45 minutos en un gel de agarosa^{R4} al 1.5 % con marcador de 1kb plus (invitrogen) y posteriormente teñidos con Bromuro de etidio al 1% durante 5-10 minutos.

Una vez que se estandarizó la PCR multiplex con las cepas tipo y se obtuvieron los productos esperados, se aplicó esta técnica al DNA de las muestras de los hisopos y al DNA de las cepas aisladas de los mismos.

2.6 PCR PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Mycoplasma* sp. del grupo *mycoides*

Se realizó la PCR punto final para la identificación de *Mycoplasma* sp del grupo *mycoides*, cuadro 5, para aquellas muestras que fueron negativas a *M. bovis*, *M. dispar* y *M. bovirhinis*.

Cuadro 5. Descripción de los iniciadores empleados en la PCR para la detección de *Mycoplasma* sp. del grupo *mycoides*

Micoplasmas	FW 5'-3'	TM *	RV 5'-3'	TM *	Producto esperado
<i>M. sp. del grupo mycoides</i>	GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG G	57.3 °C	GCC CTG GTA AGG TTC TTC GTG	57.1°C	970 pb

* TM= temperatura media de alineación, según análisis del programa IDT en línea Fw: Forward, Rv: Revers

Los oligonucleótidos presentaron homología del 100% para el grupo *mycoides* y 99% de cobertura para las especies de este grupo, para ello se utilizó el *Oligo analyzer 3.1* y el *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) del NCBI.

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

```

1 aaaat gagag ttgatcctg gctcaggata aacgctggcg gcatgcctaa tacatgcaag
61 tcgaacggag gtgcttgac ctcagtggcg aacgggtgag taacacgtat ctaacctacc
121 tcatagcggg ggataacttt tggaaacgaa agataatacc gcatgtagat cttattatcg
181 catgagaaaa gatcaaaaga accgtttggt tcactatgag atgggggatgc ggcgtattag
241 ctagtaggtg agataatagc ccacctaggc gatgatacgt agccgaactg agaggttgat
301 cggccacatt gggactgaga tacggcccag actcctacgg gaggcagcag tagggaattt
361 ttcacaatgg acgaaagtct gatgaagcaa tgccgcgtga gtgatgacgg cttcggggtt
421 gtaaagctct gttgtaaggg aagaaaaaat aaagtaggaa atgactttat cttgacagta
481 cttaccaga aagccacggc taactatgtg ccagcagccg cggtaatata taggtggcaa
541 gcgttatccg gatttattgg gcgtataggg tgcgtaggcg gttttgcaag tttagaggta
601 aagtcgggag ctcaactccg gttcgcttg aaaactgtat tactagaatg caagagaggt
661 aagcggaatt ccatgtgtag cgggtgaaatg cgtagatata tggaagaaca cctgtggcga
721 aagcggttta ctggcttgtt attgacgctg aggcacgaaa gcgtggggag caaataggat
781 tagataccct agtagtcac gccgtaaacg atgagtacta agtgttggg taactcagcg
841 ctgcagctaa cgcattaagt actccgcctg agtagtatgc tcgcaagagt gaaactcaaa

```

901 ggaattgacg gggacccgca caagtgggtg agcatgtggt ttaattcgaa gcaacacgaa
 961 gaaccttacc agggccttgac atccagtgc aagctataga gatatagtag aggttaacat
 1021 tgagacaggt ggtgcatggt tgtcgtcagt tcgtgccgtg aggtgttggg ttaagtcccg
 1081 caacgaacgc aacccttctc gttagtact aacattaagt tgagaactct aacgagactg
 1141 ctagtgttaag ctagaggaag gtggggatga cgtcaaata tcatgccctt tatgtcctgg
 1201 gctacacacg tgctacaatg gctggtacaa agagttgcaa tcctgtgaag gggagctaata
 1261 ctcaaaaaac cagtctcagt tcggattgaa gtctgcaact cgacttcatt 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

- *Mycoplasma* sp. del grupo *mycoides*, que codifica al gen 16s ribosomal RNA (*rrnB*). Con un peso de 970 pb. Rojas 2013

La reacción utilizada para la identificación de *M. mycoides*, se muestra en el cuadro 6.

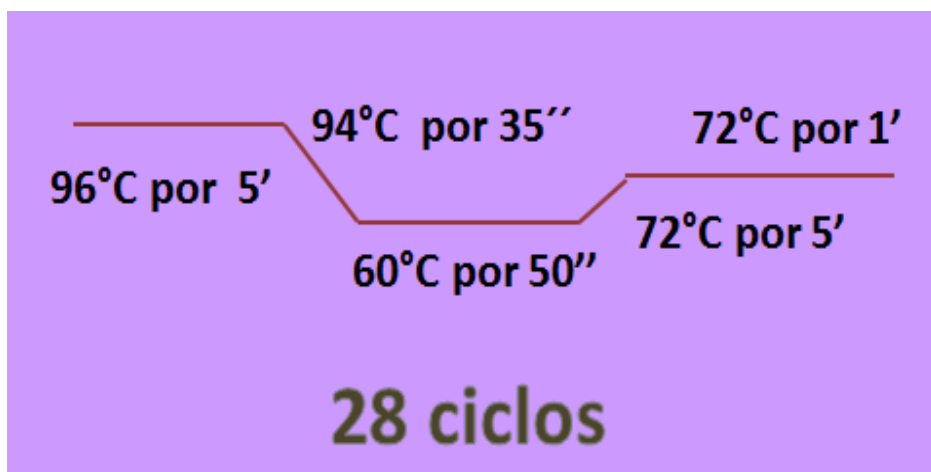
2.6.1 Reacción para la PCR de *Mycoplasma* sp. del grupo *mycoides*

Cuadro 6.- Cantidad y reactivos utilizados en la reacción de la PCR para la detección de *M. mycoides*

Reactivo	Cantidad
Buffer 10x	2.5 µl
MgCl 50 Mm	1.75 µl
Dntp's 10 Mm	1 µl
Fw <i>M. mycoides</i> del grupo <i>mycoides</i> 20 pmol	1µl
Rv <i>M. mycoides</i> del grupo <i>mycoides</i> 20 pmol	1µl
DNA	5 µl
Agua	12.5 µl
Taq	0.25 µl
TOTAL	25 µl

2.6.2 Amplificación de los productos de la PCR para *Mycoplasmas* sp. del grupo *mycoides*

Los tiempos para la amplificación de los productos de la PCR para la identificación de *Mycoplasma* sp. del grupo *mycoides* fueron:



Los resultados fueron visualizados en gel de agarosa a 1.5% a las constantes de 85 Volts, 500MAP, 45 minutos y teñidos con bromuro al 1%

2.6.3 Digestión enzimática para la identificación de la subespecies *capri* y *mycoides* de *Mycoplasma mycoides*

Los productos positivos a la PCR de *Mycoplasma* del grupo *mycoides* fueron sometidos a la digestión con la enzima AluI para diferenciar a las especies *M. mycoides* subsp *capri* y *M. mycoides* subsp *mycoides* SC.

Para la realización de la digestión, se llevó a cabo la reacción (cuadro 7) como lo refirió Rojas en 2013.

Cuadro 7.- Mezcla para la digestión con la enzima Alul para identificar a *M. mycoides* subsp *capri* y *M. mycoides* subsp *mycoides* SC

Reactivo	Cantidad μ l
Agua	7
Buffer	2
Reacción de PCR	10
Enzima Alul	1
TOTAL	20

1. Incubar la reacción en baño maría a 37°C por una hora, después.
2. Inactivar la acción enzimática incubando a 65°C por 20 minutos.
3. Depositar la reacción en un gel de agarosa al 2%, correr la electroforesis a 75Volts, 500 Map, por 1.47 minutos con marcador de peso molecular 50 pb de invitrogen, teñir el gel con bromuro de etidio al 1%. Con la digestión se esperan dos cortes para *M. mycoides* subsp *mycoides* SC, y tres cortes para *M. mycoides* subsp *capri* (cuadro 8)

Cuadro 8.- Identificación de las subsp de *M. mycoides*, en base a la digestión enzimática con la enzima Alul

Especie ident.	Posición de los cortes	Secuencia	Peso molecular de los cortes (pb)
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>Capri</i>	235, 421, 605	AGCT	365, 235, 190, 180
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>Mycoides</i>	421 y 605	AGCT	421, 365

2.7 CANTIDAD NECESARIA DE DNA PARA LAS DISTINTAS PCRs

Se cuantifico el DNA extraído de las cepas tipo, con el fin de determinar la sensibilidad de detección en las pruebas de PCR punto final y PCR multiplex, con la ayuda de un nanodrop³ (cuadro 9).

Cuadro 9. Cantidades mínimas necesarias de DNA para las distintas PCRs

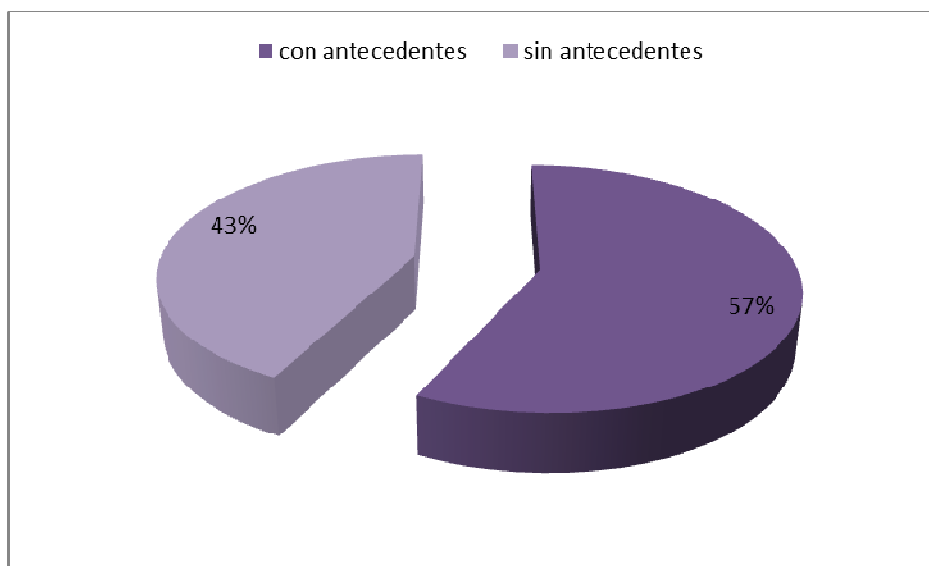
Cepa tipo	Lecturas de DNA en nanogramos/ 1µl
<i>Mycoplasma</i> sp. (16s RNAr)	1
<i>M. bovis</i>	13
<i>M. dispar</i>	10
<i>M. bovirhinis</i>	10
Mix de 3 cepas para PCR multiplex	4
<i>Mycoplasma</i> sp. del grupo <i>mycoides</i>	1

El DNA extraído de las muestras fue suspendido en 30 µl de agua destilada estéril, se cuantificó el contenido de DNA en el nanodrop y en casos de lecturas bajas (2 nanogramos por 1µl) se puso el doble de DNA para la PCR multiplex, ya que 1 nanogramo por 1 µl fue suficiente para que amplifique el gen para la PCR ARN ribosomal 16s.

3. RESULTADOS.

De las 335 muestras de hisopos nasales 194 (57.91%) bovinos provinieron de UPL con antecedentes de enfermedades respiratorias y 141 (42.08%) sin antecedentes de enfermedad respiratoria. Gráfica 1

Gráfica 1.- Porcentaje de muestras según antecedentes respiratorios.



4. 1 MUESTRAS POSITIVAS AL AISLAMIENTO Y PCR 16'S ARNr PARA EL GÉNERO

Mycoplasma sp.

3.1.1 Muestras positivas al aislamiento del género *Mycoplasma* sp.

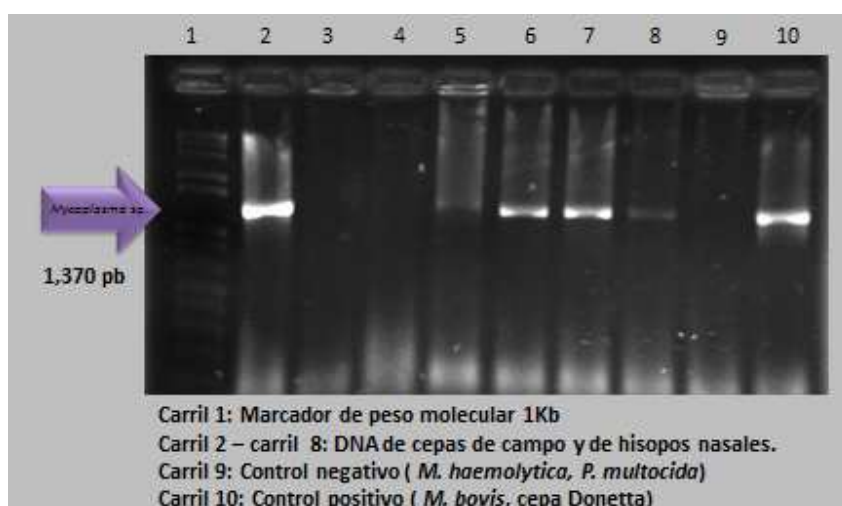
De las 335 muestras analizadas, 87 (25.9%) resultaron positivas al aislamiento de micoplasmas. Según el grupo de estudio: 9/141 (6.38%) muestras positivas

procedían de animales sin antecedentes y 78/194 (40.2%) de los animales con antecedentes.

3.1.2 Muestras positivas a la PCR ARNr 16s para el género *Mycoplasma* sp. a partir de los hisopos nasales.

De las 335 analizadas 115 (34.3%) muestras resultaron positivas para el género *Mycoplasma* sp con la PCR ARNr 16s. En el grupo de animales sin antecedentes respiratorios se obtuvieron 16/141 (11.34%) muestras positivas y en animales con antecedentes de enfermedad respiratoria 99/194 (51.03%) fueron positivas, imagen 1

Imagen 1.- Detección del gen ARNr 16'S para el género *Mycoplasma* sp de los aislados de campo y de los hisopos nasales con PCR punto final.



El número de muestras que fueron positivas a las distintas metodologías se comparan en el Cuadro 10.

Tabla 10.- Comparativo de resultados para la identificación del género *Mycoplasma* sp. de las muestras de hisopos nasales.

No. de muestra ident.	Lugar	Aislamiento	Hisopos PCR 16'S RNAr
2	Ixmiquilpan Hgo.	-	+
5	Puebla	-	+
9	Guanajuato.	+	+
4	Aguascalientes	-	+
29		+	+
49	Tizayuca Hgo.	+	+
17		-	+
115	TOTAL	87	115

Todas las cepas aisladas a partir de las 87 muestras que fueron positivas al género *Mycoplasma* sp con las pruebas realizadas (morfología, filtrabilidad por 0.45 µm y digitonina) también fueron positivas a la PCR ARNr 16s.

En contraste, se observó que 28 muestras fueron negativas al aislamiento, pero que con la prueba de la PCR ARNr 16s, que se realizó en los hisopos nasales se detectó la positividad a *Mycoplasma* sp.

3.2 IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE *Mycoplasma bovis*, *M. dispar*, *M. bovirhinis* POR LA PCR MULTIPLEX.

3.2.1 Identificación de las especies por PCR multiplex a partir de las muestras positivas a la PCR ARNr 16s

De las 115 muestras que resultaron positivas a la prueba 16s RNAr, se obtuvieron 87 muestras (75.65%) con amplificación cuando menos para una de las especies identificadas con la PCR multiplex; y se encontraron dentro de las positivas 15/85 (17.64%) muestras que amplificaron para dos especies en la PCR multiplex, Imagen 2, (Cuadro 11)

Imagen 2.- Observación de los productos de *M. bovis*, *M. dispar* y *M. bovirhinis* en la PCR multiplex, a partir de los hisopos nasales.



Cuadro 11. Total de resultados de las identificaciones de *M. bovis*, *M. dispar* y *M. bovirhinis* en la PCR multiplex, a partir de las muestras de hisopos nasales

<i>M. bovis</i>	<i>M. dispar</i>	<i>M. bovirhinis</i>	TOTAL
43	23	35	101*

a) Número de identificaciones de las especies.

Combinaciones	Número de muestras con la combinación.
<i>M. bovis</i> y <i>M. dispar</i>	8
<i>M. bovis</i> y <i>M. bovirhinis</i>	3
<i>M. dispar</i> y <i>M. bovirhinis</i>	4
TOTAL	15

b) Detección de las Interacción de las especies *M. bovis*, *M. dispar* y *M. bovirhinis* en las muestras de hisopos nasales.

* En 15 muestras se identificó a más de una especie de micoplasmas ver tabla b

Del total de 115 muestras positivas al género *Mycoplasma* sp. únicamente se obtuvieron 101 identificaciones de las especies de micoplasmas por PCR multiplex, las frecuencias se distribuyeron como sigue en base a las muestras positivas a micoplasmas: *M. bovis* 37.39%, *M. bovirhinis* 30.43% y *M. dispar* 20%, quedando únicamente 28/115 (24.34%) muestras como *Mycoplasma* sp.

3.2.2 Detección de *M. bovis*, *M. bovirhinis* y *M. dispar* por PCR multiplex a partir de los aislados, identificados como *Mycoplasma* sp.

De las 87 muestras positivas, se aislaron 99 cepas de *Mycoplasma* sp. y la detección de las especies, se muestran en el cuadro 12

Cuadro 12.- Detección de las especies *M. bovis*, *M. dispar* y *M. bovirhinis* de las muestras de hisopos nasales con la PCR multiplex.

<i>M. bovis</i>	<i>M. dispar</i>	<i>M. bovirhinis</i>	TOTAL
40	23	20	83*

a) Número de identificaciones de las especies.

Combinaciones	Número de muestras con la combinación.
<i>M. bovis</i> y <i>M. dispar</i>	8
<i>M. bovis</i> y <i>M. bovirhinis</i>	0
<i>M. dispar</i> y <i>M. bovirhinis</i>	4
TOTAL	12

b) Detección de las Interacción de las especies *M. bovis*, *M. dispar* y *M. bovirhinis* en las muestras de hisopos nasales.

* En 12 muestras se aisló e identificó más de una especie de micoplasmas, ver tabla b

De las 99 cepas aisladas, a partir de los hisopados, las frecuencias quedaron como sigue: *M. bovis* 40.4%, *M. dispar* 23.2% y *M. bovirhinis* 20.2%. Las 16 cepas restantes quedaron como *Mycoplasma* sp.

3.3 IDENTIFICACIÓN POR PCR PARA *Mycoplasma* sp. DEL GRUPO MYCOIDES

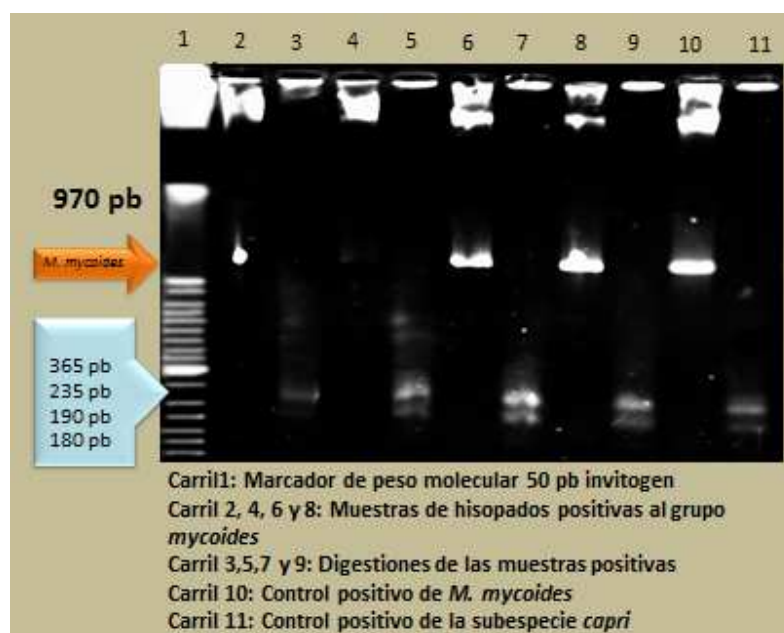
Está prueba fue realizada a todas las muestras que fueron positivas a la PCR RNAr 16s. De las 115, cuatro de ellas resultaron positivas a la PCR ARNr 16s grupo *mycoides* (imagen3)

3.3.1 Detección de las subespecies *capri* y *mycoides* del grupo *mycoides*.

A las cuatro muestras positivas al grupo *mycoides* se les realizó la digestión con la enzima *AluI*, para determinar las subespecies *capri* y *mycoides*, Imagen 3. En las cuatro muestras se detectó *M. mycoides* subsp *capri* , después de realizar la digestión con la enzima *ALUI* al presentarse tres cortes enzimáticos, Arrojando cuatro productos, 365, 235, 190 y 180 pb .

Se observó que en las cuatro muestras positivas a *M. mycoides* subsp. *capri*, en dos de ellas se detectó la interacción con *M. dispar* y *M. bovis*.

Imagen 3.- Detección de *M. mycoides* subsp *capri* con la digestión de *AluI*, con la observación de cuatro productos de bajo peso molecular.



3.4 ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DE LAS ESPECIES POR LUGARES MUESTREADOS Y ESTADO DE LA ENFERMEDAD RESPIRATORIA EN LAS ZONAS DE ESTUDIO.

3.4.1 Distribución de las especies según la ubicación de las zonas de estudio

La distribución de la especies de los micoplasmas identificados por las distintas PCRs se muestran en la cuadro 8 y grafica 2.

Cuadro 8.- Distribución de las distintas especies de micoplasma, en las diferentes zonas de estudio.

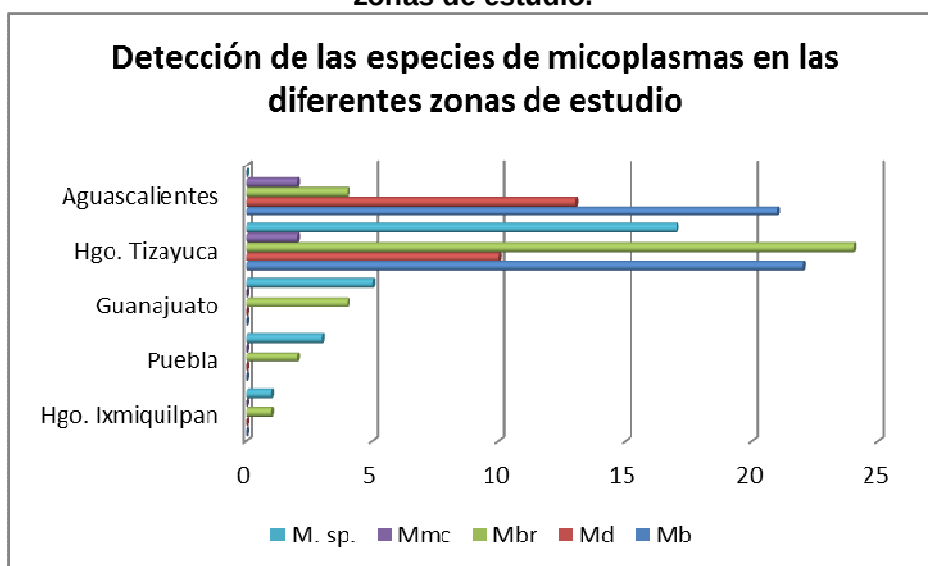
Lugar	<i>M. bovis</i>	<i>M. dispar</i>	<i>M. bovirhinis</i>	<i>M. mycoides</i>	<i>M. sp.</i>	TOTAL
Hgo. Ixmiquilpan ¹	0	0	1	0	1	2
Puebla ¹	0	0	2	0	3	5
Guanajuato ¹	0	0	4	0	5	9
Hgo. Tizayuca ²	22	10	24	2*	17	75
Agascalientes ²	21	13	4	2*	0	40
TOTAL	43	23	35	4	26	131

*Muestras que mostraron interacción con otra especie de *Mycoplasma* sp.,

1 sin antecedentes de enfermedad respiratoria

2 con antecedentes de enfermedad respiratoria

Gráfica 2.- Distribución de las especies de micoplasmas en las diferentes zonas de estudio.

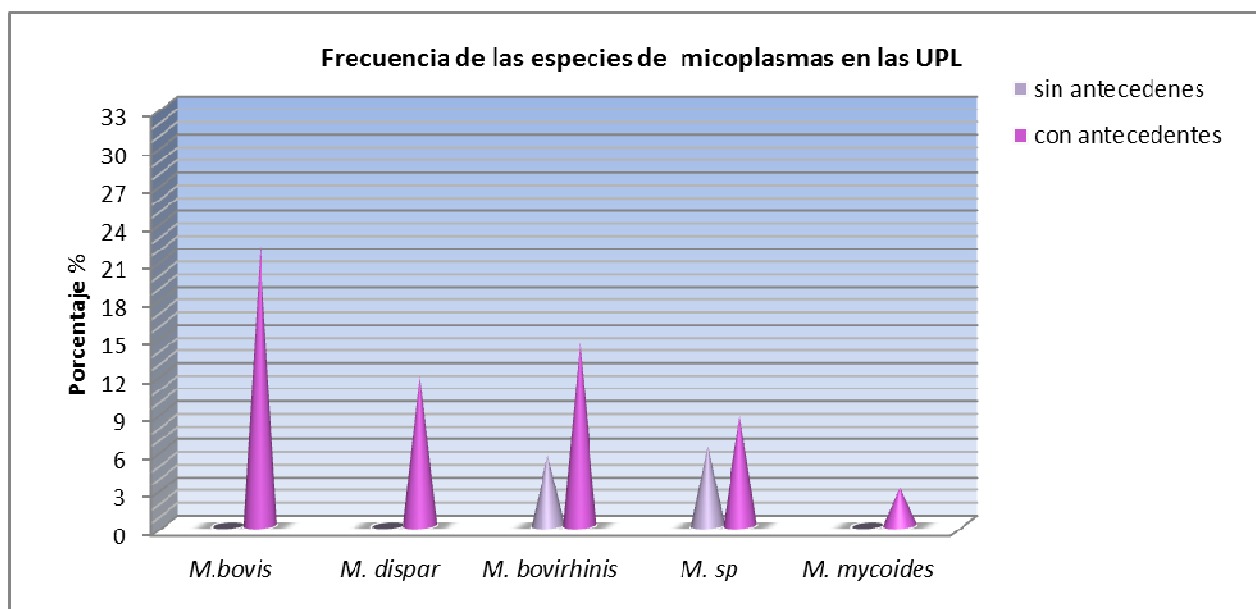


Mmc= *Mycoplasma mycoides* subsp capri, Mbr= *Mycoplasma bovirhinis*, Md= *Mycoplasma dispar*, Mb= *Mycoplasma bovis*.

3.4.2 Frecuencias de las diferentes especies según los antecedentes de enfermedades respiratorias en las UPL con y sin antecedentes de enfermedad respiratoria.

En las muestras provenientes de unidades sin antecedentes respiratorios fueron identificados únicamente *M. bovirhinis* y *Mycoplasma* sp. y en UPL con antecedentes de enfermedades respiratorias se identificó a *M. bovis*, *M. dispar* y *M. bovirhinis*, quedando en menor proporción *Mycoplasma* sp. (Grafica 3)

Gráfica 3.- Frecuencia de la identificación de las especies según la presencia de enfermedad.



3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ESTUDIO.

3.5.1 Comparación de las metodologías de aislamiento y las PCRs para la detección de las especies de micoplasmas, mediante la prueba de Kappa.

La relación entre el aislamiento y la prueba de la PCR ARNr 16s para el género *Mycoplasma* sp. a partir de los hisopos nasales, resultó con un valor de Kappa de 0.804, mismo que indica una correlación buena entre las pruebas.

La relación entre la prueba de la PCR multiplex y el aislamiento a partir de los hisopos nasales, para la detección de *M. bovis*, *M. dispar* y *M. bovirhinis*, se obtuvo una Kappa de 0.75, que indica una buena correlación entre las pruebas.

3.5.2 Análisis de la detección del género *Mycoplasma* sp. y la PCR multiplex de aislados e hisopos nasales.

La identificación molecular PCR ARNr 16 s para la PCR multiplex de las especies, a partir de los aislados y de los hisopados correspondió en un 100%, cuadro 13.

Cuadro 13.- Cuadro comparativo de la detección del género *Mycoplasma* sp. con las especies *M. bovis*, *M. dispar* y *M. bovirhinis*, a partir de aislados e hisopos

	Positivos a PCR RNAr 16's	PCR multiplex		
		<i>M. bovis</i>	<i>M. dispar</i>	<i>M. bovirhinis</i>
Aislados	87	40	23	20
Hisopo	115	43	23	35

3.5.3 Análisis estadístico de las especies identificadas con la PCR multiplex en las muestras positivas en este estudio.

La especie mayormente identificada fue *M. bovis* con un frecuencia del 37.3% del total de muestras, seguida de *M. bovirhinis* 30.4% y *M. dispar* 20%.

M. bovis y *M. dispar* fueron las especies mayormente identificadas en la población con antecedentes respiratorios ($P < 0.0001$). La presencia de *M. bovirhinis* también fue de relevancia en animales con antecedentes de enfermedad respiratoria ($P < 0.006$).

3.5.4 Identificación de las especies *M. bovis*, *M. dispar* y *M. bovirhinis* por la PCR multiplex a partir de las muestras directas.

Para la especificidad de las prueba de PCR multiplex, se determinaron homologías del 100% en los primers empleados y se tomaron como controles negativos a bacterias *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida*, que de igual forma se asocian al CRB mismas que también sirvieron como controles negativos para la PCR 16s RNAr en la identificación del género *Mycoplasma* sp.

A partir de las extracciones de DNA, de los aislados y de los hisopos nasales, se compararon resultados con la finalidad de obtener la sensibilidad de la prueba en el estudio de campo que se realizó (cuadro 14)

Cuadro 14.- Comparación de los resultados de la PCR multiplex de aislados e hisopos nasales.

	PCR +	PCR-	Total
AISL +	72	15	87
AISL -	15	13	28
Total	87	28	115

Del total de las muestras que fueron positivas al género *Mycoplasma* sp., mediante aislamiento y la PCR 16s RNAr, la PCR multiplex tipificó molecularmente al 75%. Al comparar las pruebas resultaron 15 (24.3%) muestras más positivas con las extracciones directas del hisopo en comparación con los aislados. Se determinó una especificidad y sensibilidad del 100% al encontrarse las muestras

positivas al aislamiento como positivas a la PCR 16s RNAr, por tanto la pruebas moleculares demuestran ser igualmente útiles como el aislamiento en la identificación de las especies de micoplasmas asociadas al CRB, teniendo la ventaja de acortar los tiempos para la emisión de resultados.

En el cuadro 15 se compararon los resultados de la PCR multiplex a partir de los hisopos nasales con los antecedentes de la enfermedad respiratoria en las UPL.

Cuadro 15. Cuadro de antecedentes de la enfermedad/ PCR multiplex.

PCR multiplex	Antecedentes	Sin antecedentes	Total
Positivos	80	7	87
Negativos	114	134	248
Total	194	141	335

Al tener dos grupos de estudio se identificaron muestras positivas entre la población con antecedentes de enfermedad respiratoria y en menor cantidad entre la población sin antecedentes de enfermedad respiratoria. Se encontró una sensibilidad del 41% y una especificidad del 95%. En cuanto al Valor predictivo positivo (VPP) se obtuvo un 91% y el Valor predictivo negativo (VPN) fue del 54%

5. DISCUSIÓN

La presencia de los micoplasmas en el CRB, se ha reportado como capaz de inmunosuprimir y causar la signología clínica respiratoria. Al encontrarse en coinfección con los virus este problema se agudiza en los animales, por lo cual es de importancia el estudio de este microorganismo involucrado en el CRB. En estudios realizados por Rojas en el 2013, se reportó un 32.6% (121) de aislados como *Mycoplasma* sp., a partir de 374 muestras de hisopos nasales de bovinos de producción lactea y rastros, de la zona centro y norte del país. En nuestro estudio, *Mycoplasma* sp. se aisló en un 25.9% (84) de 335 hisopos nasales de bovinos con y sin antecedentes de la enfermedad, este análisis fue desarrollado solo en la zona centro del país.

En el caso de la identificación de los micoplasmas, mediante las pruebas moleculares, Angen *et. al.*, 2009 reporto un 79% de muestras positivas para *M. bovirhinis* y *M. dispar* en 34 animales con signología de enfermedad respiratoria, mismas que resultaron negativas a la presencia de *M. bovis*. Del presente estudio, en 194 animales que comprenden la población con antecedentes de enfermedad respiratoria, se obtuvieron 80 muestras como positivas a la PCR multiplex, con las frecuencias: *M. bovis* 22.1%, *M. dispar* 11.8% y *M. bovirhinis* 14.43%. En el estudio de Rojas en 2013 se detectaron a: *M. bovis* 39.7%, *M. dispar* 24.8% y *M. mycoides* subsp *capri* 15.6% con PCRs, sin embargo, su estudio molecular se realizó a partir de cepas aisladas y en nuestro estudio, fue partiendo de muestras

directas de hisopos nasales. Para la validación de la prueba PCR multiplex, se realizó el aislamiento de las muestras a la par de la extracción directa de DNA, pero en este caso se obtuvieron 28 (24.3%) muestras más como positivas mediante la técnica molecular en comparación al aislamiento.

Este estudio detectó, a partir de la extracción de DNA de los hisopos nasales (335), un 34.3% (115) como *Mycoplasma* sp., mediante la PCR 16s RNAr, y una vez tipificadas con la PCR multiplex se reportaron las siguientes frecuencias para: *M. bovis* 37.3%, *M. bovirhinis* 30.4% y *M. dispar* 20%. La identificación con la PCR multiplex, se logró en el 25.9% (87) del total de muestras (335). En la población con antecedentes de enfermedad respiratoria (194) las frecuencias fueron: *M. bovis* 22.1%, *M. bovirhinis* 14.4 % y *M. dispar* 11.8 %, donde claramente la presencia de *Mycoplasma bovis* es mayor a las otras especies que identifica la PCR multiplex, esta prueba pudo tipificar en un 70% a las muestras positivas al género *Mycoplasma* sp.

La PCR multiplex, busca proporcionar una prueba diagnóstica menos costosa y que en menor tiempo emita un resultado en cuanto a la presencia de las especies de micoplasmas, que se asocian mayormente al CRB. Con esta prueba en una semana o menos se podría dar un resultado en cuanto a la presencia de este microorganismo en los hatos, facilitando un adecuado tratamiento, además de efficientar las posibles medidas zoonosanitarias, que en conjunto conlleva a evitar mayores pérdidas económicas en las unidades de producción.

La importancia de las especies asociadas al CRB esta relacionada con la patogenia, signos clínicos y hallazgos a la necropsia.

Mycoplasma bovis que en este trabajo se encontró en un 37.3% es reconocido ampliamente como un agente etiológico en el CRB, al ser causante de neumonía en bovinos, pudiendo ser aislado a partir de la cavidad nasal, de lavados bronqueoalveolares y del pulmón. Esta especie es considerada de difícil eliminación dentro de los hatos, debido a que presenta variabilidad antigénica, evade la fagocitosis y es de rápida diseminación (Gagea, *et. al.*, 2006), lo cual aunado a un inadecuado tratamiento de la enfermedad y un estado de estrés, con el consecuente incremento de corticoides en el animal, se vuelven factores preponderantes en la propagación y la permanencia de esta bacteria entre la población.

M. dispar se ha reportado como causante de enfermedad respiratoria de los bovinos, el porcentaje obtenido en este estudio fue del 20%, siendo la especie identificada con menor frecuencia, de las tres que identificó la PCR multiplex. Gourlay 1982; Pirie y Allan, 1975 refieren que el aislamiento de este microorganismo se ve mayormente en bovinos adultos, donde se llegan a observar lesiones neumónicas, se ha observado que en los jóvenes causa únicamente inmunosupresión. En este estudio, los animales en los que se identificó de esta especie, presentaron de 180 a 225 días de edad.

Mycoplasma bovirhinis fue la segunda especie del género *Mycoplasma* sp. hallada con mayor frecuencia (30.4%) en este estudio, además de ser la única de

las tres encontrada en animales sin antecedentes de enfermedad respiratoria. Estudios realizados sobre esta especie llevaron a postular a los autores que *M. bovirhinis* es microbiota de la cavidad nasal de bovinos, por lo que es regularmente encontrada en bovinos clínicamente sanos, siendo reportada incluso con mayor frecuencia que *M. bovis* (Gourlay et. al., 1979 y Julian et. al., 1992). Por otro lado, *M. bovirhinis* se ha aislado a partir de los pulmones de animales con enfermedad respiratoria, sin embargo, en este punto hay que considerar que una vez que el animal se encuentra inmunosuprimido, por algún virus, cierto tipo de microbiota puede beneficiarse al ser modificadas las condiciones medioambientales, como pH, temperatura, etc. y proliferar sobre otras bacterias. En el caso *M. bovirhinis* al encontrarse en la cavidad nasal, puede ser arrastrado a través del tracto respiratorio cuando el bovino cursa con enfermedad respiratoria, por tanto este puede llegar hasta el pulmón, logrando proliferar en el mismo y coadyuvar causando neumonía junto con otros agentes etiológicos. (Tegtmeier, et. al., 1999, Agen, et al., 2008)

Por otra parte, se debe considerar que el CRB comprende otros agentes etiológicos como los virus y que en el caso de *M. bovis*, que presenta variabilidad antigénica por la presencia de las proteínas de superficie (Vsps), al encontrarse acompañada de virus, como el VHB-1, se han observado neumonías en estudios *posmortem*, donde previa inoculación experimental de ambos agentes se encontraron más lesiones en los pulmones (Prysliak, et. al., 2011). Se ha postulado, que la persistencia de *M. bovis* se ve acentuada con la inflamación y la

posterior respuesta immune, ya que Kleinschmidt *et. al.*, en 2012, observaron que *M. bovis* permanecía alrededor de lesiones necróticas pulmonares, con la presencia de macrófagos y neutrófilos, por lo que concluyen que la fagocitosis no podía terminar definitivamente con el agente. Es común encontrar a la necropsia, bronconeumonía caseosa y necrosis coagulativa, con pobre respuesta al tratamiento con antibióticos en neumonías crónicas (Caswell, *et. al.*, 2008).

La importancia de los estudios *posmortem* en las enfermedades respiratorias de los bovinos, se basa en la orientación hacia los posibles agentes involucrados. La ventaja de los estudios moleculares, es la oportunidad de poder llevar acabo extracción de DNA, a partir de los tejidos, en el caso de muerte del animal, por lo que la PCR multiplex además de eficientar el diagnóstico, en costos y tiempo, es más flexible en comparación a otras técnicas como las pruebas serológicas.

En la comparación de la tipificación molecular y la técnica de aislamiento como medios diagnósticos, se debe considerar el fundamento de cada técnica; en el caso del aislamiento, sólo se puede evidenciar la presencia del microorganismo en bacterias viables. En el análisis bacteriológico, la cantidad bacteriana contenida en la muestra, el curso de la enfermedad en la que se encontraba el animal en el momento del muestreo, entre otros, son factores que deben ser considerados y en el caso de la PCR multiplex se puede realizar a partir de un pequeño número de bacterias, sin importar el estado del animal, por lo que se vuelve una importante herramienta para la identificación de especies de micoplasmas involucradas en el

CRB, logrando además la tipificación de estas bacterias en menor tiempo en comparación al aislamiento.

Por lo que al realizar la PCR multiplex para las tres especies de micoplasmas *M.bovis*, *M.dispar*, *M. bovirhinis*, técnica aplicada tanto en los aislados de micoplasmas como en los hisopos nasales directos, obtuvimos mayor porcentaje de positividad, alrededor del 10%, en las muestras de hisopos directos sobre los aislados de micoplasmas. Aunque el aislamiento del agente etiológico es considerada la prueba oro, para obtener el aislamiento del agente tenemos las siguientes desventajas: el tratamiento antimicrobiano que se haya dado al bovino que inhibe a los micoplasmas, sustancias micoplasmacidas propias del huésped, el mal manejo y conservación de la muestra para lograr el aislamiento, estos factores conducen a que la viabilidad del microorganismo no sea factible. Es así, que para la técnica molecular, aunque existan estos factores podemos realizar la extracción del ADN, aunque no haya viabilidad del micoplasmas podemos aplicar la PCR multiplex y poder detectar las especies de micoplasmas involucrados en el complejo respiratorio bovino.

6. CONCLUSIONES

- ✓ A partir de las 335 muestras resultaron 115 (34.3%) positivas para *Mycoplasma* sp., con la PCR RNAr 16S
- ✓ La PCR RNAr 16S detectó a *Mycoplasma* sp. en un 41.2% (80/194) de las muestras de hisopos nasales de los animales con antecedentes de enfermedad respiratoria, lo que hace a este género bacteriano relevante en la enfermedad respiratoria de los bovinos.
- ✓ La frecuencia de las especies identificadas de micoplasmas fueron: *M. bovis* 37.3%, *M. bovirhinis* 30.4% y *M. dispar* 20% en la población de estudio con antecedentes y sin antecedentes respiratorios.
- ✓ La frecuencia de las especies de micoplasmas en los bovinos con antecedentes respiratorios fue: *M. bovis* 22.1%, *M. bovirhinis* 14.4 % y *M. dispar* 11.8 %
- ✓ *M. bovis* fue la especie identificada con mayor frecuencia por la PCR multiplex en hisopos nasales de animales con antecedentes respiratorios y no fue detectada esta especie en animales sin antecedentes de enfermedad respiratoria.
- ✓ La PCR multiplex, fue capaz de detectar hasta 4 nanogramos de DNA en un microlitro, depositando en la reacción hasta 5 µl DNA, de la muestra

- ✓ *M. bovirhinis* fue la única especie detectada por la PCR multiplex en animales sin antecedentes de la enfermedad respiratoria.
- ✓ La PCR multiplex resultó ser una técnica específica 95% y una sensibilidad de 41% en los animales de estudio, que permitió la tipificación molecular de *M. bovis*, *M. dispar* y *M. bovirhinis*, a partir de hisopos nasales directos.

6. REFERENCIAS

- Al-Momani, Nicholas, Janakat, Abu-Basha, Ayling, The in vitro effect of six antimicrobials against *Mycoplasma putrefaciens*. *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC and *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* isolated from sheep and goats in Jordan. *Trop Anim Health Prod*, 38:1–7. 2006
- Amanfu W. Contagious bovine pleuropneumonia (lung sickness) in Africa, Onderstepoort J Vet Res, 76,13-7, 2009
- Angen, Thomsen, Larsen, Larsen, Kokotovic, Heegaard, Enemark, Respiratory disease in calves: Microbiological investigations on trans-tracheally aspirated bronchoalveolar fluid and acute phase protein response, Vet. Microbiol, 137, 165–171, 2009
- Almeida RA, Rosenbusch RF, Capsulelike surface material of *Mycoplasma dispar* induced by in vitro growth in culture with bovine cells is antigenically related to similar structures expressed in vivo, Infect Immun. 59, 3119-25, 1991
- Bailão AM, Shrank A, Borges CL, Parente JA, Dutra V, Felipe MS, Fiúza RB, Pereira M, de Almeida Soares CM, The transcriptional profile of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells is influenced by human plasma, FEMS Immunol Med Microbiol. 51, 43-57, 2007
- Bednarek, Ayling, Nicholas, Dudek, Szymańska-Czerwinska, Serological survey to determine the occurrence of respiratory *Mycoplasma* infections in the Polish cattle population., Vet Rec. 171,45, 2012
- Bennett, R. H., and D. E. Jasper, Nasal prevalence of *Mycoplasma bovis* and IHA titers in young dairy animals. Cornell Vet. 67, 361–373, 1977.
- Blanchard, Saillard, Kobisch, Bove, Analysis of putative ABC transporter genes in *Mycoplasma hyopneumoniae*. Microbiology 142, 1855–1862, 1996

- Blanco Viera Francisco Javier, Serotipos de *Pasteurella multocida* y *Pasteurella haemolytica* Aislada a partir de pulmones con lesiones neumonicas en rumiantes domesticos, tesis de maestría, UNAM,1990
- Henrich Birgit, Hopfe Miriam, Kitserow Annette, The Adherence-Associated Lipoprotein P100, Encoded by an opp Operon Structure, Functions as the Oligopeptide-Binding Domain OppA of a Putative Oligopeptide Transport System in *Mycoplasma hominis*, J. Bacteriol., 181, 4873-4878, 1999.
- Booker C., Abutarbush S., Morley P., Timothy P., Wildman B., Kee J., Schunicht, Pittman T., Perrett T., Ellis J., Appleyard and Haines D., The effect of bovine viral diarrhea virus infections on health and performance of feedlot cattle, Can Vet J., 49, 253-260, 2008
- Browning GF, Marenda MS, Noormohammadi AH, Markham PF, The central role of lipoproteins in the pathogenesis of mycoplasmoses, Vet Microbiol. 153, 44-50, 2011, Review
- Buchenau I, Poumarat F, Le Grand D, Linkner H, Rosengarten R, Hewicker-Trautwein M., Expression of *Mycoplasma bovis* variable surface membrane proteins in the respiratory tract of calves after experimental infection with a clonal variant of *Mycoplasma bovis* type strain PG45, Res Vet Sci. 89, 223-9, 2010
- Caswell y Archambaul, *Mycoplasma bovis* pneumonia in cattle, Animal Health Research Reviews 8, 161–186, 2008
- Citti, C., M. F. Kim, and K. S. Wise. Elongated versions of Vlp surface lipoproteins protect *Mycoplasma hyorhinis* escape variants from growth-inhibiting host antibodies. Infect. Immun, 65, 1773–1785, 1997
- Dorothy E. Krysak, Chronic pneumonia and polyarthritis syndrome in a feedlot calf, Can Vet J ;47,1019–1021, 2006
- Dunker AK, Cortese MS, Romero P, Iakoucheva LM, Uversky VN, Flexible nets. The roles of intrinsic disorder in protein interaction networks, FEBS J. 272, 5129-48, 2005, Review

- Farshid M. Shahriar, Edward G. Clark, Eugene Janzen, Keith West, Gary Wobeser, Coinfection with bovine viral diarrhea virus and *Mycoplasma bovis* in feedlot cattle with chronic pneumonia, *Can Vet J*, 43, 2002.
- Fernández Martínez Víctor Arturo, Aislamiento E Identificación Del Virus Parainfluenza-3 de los Bovinos, tesis de licenciatura, UNAM, 1980
- Field, Wills, Abundant microsatellite polymorphism in *Saccharomyces cerevisiae*, and the different distributions of microsatellites in eight prokaryotes and *S. cerevisiae*, result from strong mutation pressures and a variety of selective forces. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 1647–1652, 1998
- Fulton, Purdy, Confer, *et. al*; Bovine viral diarrhea viral infections in feeder calves with respiratory disease; interactions with *Pasteurella* spp., parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus. *Can J Vet Res* 64, 151–159, 2000
- Gourlay RN, Howard CJ, Respiratory mycoplasmosis, *Adv Vet Sci Comp Med*. 26, 289-332, 1982, Review
- Gourlay RN, Howard CJ, Thomas LH, Wyld SG., Pathogenicity of some *Mycoplasma* and *Acholeplasma* species in the lungs of gnotobiotic calves, *Res Vet Sci* , 27, 233-7, 1979
- Griffin D: Economic impact associated with respiratory disease in beef cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 13: 367–377, 1997
- Groisman, Casadesus, The origin and evolution of human pathogens. *Mol Microbiol* 56:1–7 van der Woude MW, Bañumler AJ, Phase and antigenic variation in bacteria. *Clin Microbiol* 17, 581–611, 2004, Review
- Haines, Martin, Clark, Kee, The immunohistochemical detection of *Mycoplasma bovis* and bovine virus diarrhea virus in tissues of feedlot cattle with chronic unresponsive respiratory disease and/or arthritis. *Can Vet J*, 42, 857–860, 2001
- Hirose, Kobayashi, Ito, Kawasaki, Zako, Kotani, Ogawa, Sato, Isolation of *Mycoplasmas* from Nasal Swabs of Calves affected with Respiratory Diseases and Antimicrobial Susceptibility of their Isolates, *J. Vet. Med. B* 50, 347–351, 2003

- Hotzel, Sachse, Pfützner 1996, Rapid detection of *Mycoplasma bovis* in milk samples and nasal swabs using the polymerase chain reaction, J Appl Bacteriol. 80, 505-510, 1996
- Howard, Taylor, Collin and Gourlay, Interaction of *Mycoplasma dispar* and *Mycoplasma agalactiae* subsp. *bovis* with Bovine Alveolar Macrophages and Bovine Lacteal Polymorphonuclear Leukocytes, Infect. Immun., 14, 11-17, 1976
- Howard, Rosenbusch, Lloyd, Mycoplasmosis in animals: laboratory diagnosis, Ames: Iowa State University, 1994
- Hermeyer, Buchenau, Thomasmeyer, Baum, Spargser, Rosengarten and Hewicker-Trautwein, Chronic pneumonia in calves after experimental infection with *Mycoplasma bovis* strain 1067: immune response, Act. Vet. Scan, 54, 9, 2012
- Htun, Dahlberg, Topology and formation of triplestrandedH-DNA. Science 243,1571–1576, 1989
- Htun H, Dahlberg JE, Topology and formation of triple-stranded H-DNA, Science., 243, 1571-1576, 1989, Review
- Indiková I, Much P, Stipkovits L, Siebert-Gulle K, Szostak MP, Rosengarten R, Citti C, Role of the GapA and CrmA cytheadhesins of *Mycoplasma gallisepticum* in promoting virulence and host colonization, Infect Immun. 81,1618-1624, 2013
- James Y. Adamu, Nadeeka K. Wawegama, Glenn F. Browning, Philip F. Markham, Membrane proteins of *Mycoplasma bovis* and their role in pathogenesis, Vet. Med. Sci, 95, 321–325, 2013
- Jaramillo Arango Carlos Julio, Caracterización epidemiológica de los serotipos y genotipos de *Mannheimia haemolytica* en bovinos de dos cuencas lecheras de México, tesis de doctorado, UNAM, 2007

- Johnson C, Kannan TR, Baseman JB, Cellular vacuoles induced by *Mycoplasma pneumoniae* CARDS toxin originate from Rab9-associated compartments, PLoS 6, 22877, 2011
- Jorge L. Medina¹, Jacqueline J. Coalson², Edward G. Brooks³, Vicki T. Winter², Adriana Chaparro¹, Molly F. R. Principe³, Thirumalai R. Kannan¹, Joel B. Baseman¹, and Peter H. Dube¹, *Mycoplasma pneumoniae* CARDS Toxin Induces Pulmonary Eosinophilic and Lymphocytic Inflammation, AM J RESP CELL MOL, 46, 2012
- Jiménez Meneses Alejandro, Aislamiento y tipificación bioquímica de *Mycoplasma* spp. en muestras de leche e hisopos nasales de caprinos / tesis que para obtener el título de Médico Veterinario Zootecnista, presenta Alejandro Jiménez Meneses; asesor Rosa Elena Miranda Morales, Francisco José Trigo Tavera, UNAM, 2011
- Juárez Barranco Felipe, Estudio patológico, microbiológico y epidemiológico de enfermedades respiratorias en bovinos de engorda en Sinaloa, México, Tesis de maestría, UNAM, 2001
- Karlin, Mrazek, Campbell, Frequent oligonucleotides and peptides of the *Haemophilus influenzae* genome. Nucleic Acids Res 24, 4263–4272, 1996
- Kleinschmidt S, Spargser J, Rosengarten R, Hewicker-Trautwein M., Long-term survival of *Mycoplasma bovis* in necrotic lesions and in phagocytic cells as demonstrated by transmission and immunogold electron microscopy in lung tissue from experimentally infected calves., Vet Microbiol, 162, 949-953, 2012
- Kashi y King, Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution. Trends Genet 22, 253–259, 2006
- Laak, Noordergraaf, Dieltjes, Prevalence of mycoplasmas in the respiratory tracts of pneumonic calves, Zentralbl Veterinarmed B, 39, 553-562, 1992
- Lottenberg, A novel approach to explore the role of plasminogen in bacterial pathogenesis, Trends Microbiol, 5, 466-467, 1997

- Lysnyansky I1, Sachse K, Rosenbusch R, Levisohn S, Yogev D, The vsp locus of *Mycoplasma bovis*: gene organization and structural features, J Bacteriol. ,181, 5734-5741, 1999
- McAuliffe L, Ayling RD, Nicholas RA, Identification and characterization of variable-number tandem-repeat markers for the molecular epidemiological analysis of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* SC, FEMS Microbiol Lett. , 276, 181-188, 2007
- Masiga, Domenech, Windsor, Manifestation and epidemiology of contagious bovine pleuropneumonia in Africa, Rev.-Off. Int. Epizoot, 15, 1283–1308, 1996
- Miranda Morales. Patogenicidad de micoplasmas involucrados en la mastitis bovina ,Tesis Maestria (Maestria en Ciencias Veterinarias (Patologia Animal)-UNAM, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 1999.
- Moxon, Rainey, Nowak, Lenski, Adaptive evolution of highly mutable loci in pathogenic bacteria. Curr Biol 4, 24–33, 1994
- Mra'zek, Analysis of distribution indicates diverse functions of simple sequence repeats in *Mycoplasma* genomes. Mol Biol Evol 23, 1370–1385, 2006
- Nicholas y D. Ayling, *Mycoplasma bovis*: Disease, diagnosis and control. Res. Vet. Sci. 74, 105–112, 2003
- Northern Ireland disease surveillance report, Northern Ireland disease surveillance report, Veterinary Record, 2014
- Palmer, Lipsitch, Moxon y Baylis, Broad Conditions Favor the Evolution of Phase-Variable Loci, mBio, January/February 2013 Volume 4 Issue 1
- Persson, Jacobsson, Frykberg, Johansson, Poumarat, Variable Surface Protein Vmm of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony Type, 2004, J MICROBIOL, 3712–3722, 2002
- Oscar Q. Pich, Raul Burgos, Mario Ferrer-Navarro, Enrique Querol and Jaume Pinol, Role of *Mycoplasma genitalium* MG218 and MG317 cytoskeletal proteins in terminal organelle organization, gliding motility and cytoadherence, Microbiol, 154, 3188–3198, 2008
- Pirie HM, Allan EM, Mycoplasmas and culling pneumonia in a group of calves, Vet Rec. , 1;97, 345-349, 1975

- Provost, Perreau, Breard, Le Goff, Martel, Cottew, Contagious bovine pleuropneumonia, Rev.-Off. Int. Epizoot, 6, 625–679, 1987
- Prysliak T, van der Merwe J, Lawman Z, Wilson D, Townsend H, van Drunen Littel-van den Hurk S, Perez-Casal J, Respiratory disease caused by *Mycoplasma bovis* is enhanced by exposure to bovine herpes virus 1 (BHV-1) but not to bovine viral diarrhea virus (BVDV) type 2, Can Vet J. 11, 1195-1202, 2011
- Pijoan, Chávez, Costos provocados por neumonías en becerras lacheras para reemplazo, mantenidas bajo dos sistemas de alojamiento. Vet Méx, 34, 333-342, 2003
- Prysliak T., Van der Merwe J., Lawman Z., Wilson D., Townsend H, Van Drunen S. and Perez J., Respiratory disease caused by *Mycoplasma bovis* is enhanced by exposure to bovine virus 1 (BHV-1) but not to bovine viral diarrhea virus (BVDV) TYPE 2, Can Vet J., 52, 1195-1202, 2011.
- Qi J, Guo A, Cui P, Chen Y, Mustafa R, Ba X, Hu C, Bai Z, Chen X, Shi L, Chen H, Comparative geno-plasticity analysis of *Mycoplasma bovis* HB0801 (Chinese isolate), PLoS One, 7, 5, 2012
- Raizin, Yoguev, Molecular Biology and Pathogenicity of *Mycoplasmas*, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62, 1094-1156, 1998
- Rocha y Blanchard, Genomic repeats genome plasticity and the dynamics of *Mycoplasma* evolution. Nucleic Acids Res, 30, 2031–2042, 2002
- Rojas Trejo Verónica, Tipificación de micoplasmas aislados de bovinos con problemas respiratorios en México, tesis que para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Producción de la Salud Animal, tutores principales de tesis Rosa Elena Miranda Morales, Francisco J. Trigo Tvera, Laura Jaramillo Meza, 2013.
- Rosengarten and Citti. The role of ruminant mycoplasmas in systemic infection in *Mycoplasmas* of Ruminants: Pathogenicity, Diagnostics, Epidem. Molec. Gen. , 3, 14–17 , 1999

- Ruiz Garduño Cramina, Valoración *in vitro* de las solución de superoxidación como desinfectante contra los virus del complejo respiratorios (PI3, IBR, DVB Y VSRB) y otavirus que afectan a los bovinos, , tesis de licenciatura , UNAM, 2010
- Sambrook and Russell, Molecular cloning a laboratory manual Vol.I 3rd ed. Cold Spring Habor New York USA, 2001:6.61-6.62
- Sánchez Valdez Oscar, Dinamica de la infección de los virus del complejo respiratorio bovino: IBR, DVB, PI-3 y VRSB y evaluación de la respuesta a la vacunación de hatos de la cuenca del valle del mezquital, Hidalgo, tesis de maestría, UNAM, 2010
- Schmidt JA, Browning GF and Markham, Mycoplasma hyopneumoniae p65 surface lipoprotein is a lipolytic enzyme with a preference for shorter-chain fatty acids. J Bacteriol 186, 5790-5798, 2004.
- Subramaniam S, Frey J, Huang B, Djordjevic S, Kwang J, Immunoblot assays using recombinant antigens for the detection of Mycoplasma hyopneumoniae antibodies, Vet Microbiol. I , 3, 99-106, 2000
- Shahriar, Clark, Janzen, West, Wobeser, Coinfection with *Bovine viral diarrhea virus* and *Mycoplasma bovis* in feedlot cattle with chronic pneumonia. Can Vet J; 43, 863–868. 2002
- Shafer y Smirnov, Biological aspects of DNA/RNA quadruplexes. Biopolymers 56, 209–227, 2000
- Sorden SD, Kerr RW, Janzen ED, Interstitial pneumonia in feedlot cattle: concurrent lesions and lack of immunohistochemical evidence of bovine respiratory syncytial virus infection. J Vet Diagn Invest 12, 510–517,2000
- Storz, Stine, Liem, Anderson, Coronavirus isolation from nasal swab samples in cattle with signs of respiratory tract disease after shipping. J Am Vet Med Assoc 208, 1452–1455, 1996

- Snowden, G. D., L. D. Van Vleck, L. V. Cundiff, and G. L. Bennett., Bovine respiratory disease in feedlot cattle: Environmental, genetic and economic factors. J. Anim. Sci. 84:1999–2008, 2006.
- Thomas, A., Linden, A., Mainil, J., Bischof, D. F., Frey, J. & Vilei, E. M. , *Mycoplasma bovis* shares insertion sequences with *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC: evolutionary and developmental aspects. FEMS Microbiol Lett 245, 249–255, 2005
- Toomas Orro, Tarja Pohjanvirta, Ulla Rikula, Anita Huovilainen, Sakari Alasuutari, Liisa Sihvonen, Sinikka Pelkonen, Timo Soveri, Acute phase protein changes in calves during an outbreak of respiratory disease caused by bovine respiratory syncytial virus, Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 34, 23–29, 2011
- Tegtmeier C, Uttenthal A, Friis NF, Jensen NE, Jensen HE, Pathological and microbiological studies on pneumonic lungs from Danish calves, Zentralbl Veterinarmed B. , 46, 693-700, 1999
- Tegtmeier C, AngenO, Grell SN, Riber U, Friis NF, Aerosol challenge of calves with *Haemophilus somnus* and *Mycoplasma dispar*, Vet Microbiol. 72, 229-39, 2000
- Trigo TFJ: El Complejo Respiratorio Infeccioso de los Bovinos y Ovinos. Ciencia veterinaria 4. 1987. P1-36
- Vilei, Korczak, Frey , *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC can be grouped into a single subspecies, Vet. Res, 37, 779–790, 2006.
- Toth, Ga'spa'ri, Jurka, Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. Genome Res, 10, 967– 981, 2000
- Hermeyer K, Buchenau I, Thomasmeyer A, Baum B, Spargser J, Rosengarten R, Hewicker-Trautwein M, Chronic pneumonia in calves after experimental infection with *Mycoplasma bovis* strain 1067: characterization of lung pathology, persistence of variable surface protein antigens and local immune response, Acta Vet Scand. 4, 54-59, 2012

- Tseng CW, Kanci A, Citti C, Rosengarten R, Chiu CJ, Chen ZH, Geary SJ, Browning GF, Markham PF, MalF is essential for persistence of *Mycoplasma gallisepticum* in vivo, *Microbiology*, 159, 1459-70, 2013
- Thomas A, Linden A, Mainil J, Dizier I, Baseman JB, Kannan TR, Fleury B, Frey J, Vilei EM, The p40* adhesin pseudogene of *Mycoplasma bovis*, *Vet Microbiol.* 104, 213-217, 2004
- Tully J.G. Clonic and filtration, *Techniques for Mycoplasmas*. In: *Methods in Micoplasmology*. Razin S y Tully J. G. Estados Unidos: Academic Press, 1983; 173-177
- Washburn, L. R., K. E. Weaver, E. J. Weaver, W. Donelan, and S. Al-Sheboul, Molecular characterization of *Mycoplasma arthritidis* variable surface protein MAA2. *Infect. Immun.* 66, 2576–2586, 1998
- Wise KS, Foecking MF, Röske K, Lee YJ, Lee YM, Madan A, Calcutt MJ, Distinctive repertoire of contingency genes conferring mutation- based phase variation and combinatorial expression of surface lipoproteins in *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* of the *Mycoplasma mycoides* phylogenetic cluster, *J Bacteriol.* 188, 4926-4941, 2006
- Washburn, LR., Bird, DW., and Dybvig, K, restoration of cytoadherence to an adherence deficient mutant of *Mycoplasma arthritidis* by genetic complementation, *Infect. Immun*, 71, 671-675, 2003
- Yates, A Review of Infectious Bovine Rhinotracheitis, Shipping Fever Pneumonia and Viral-Bacterial Synergism in Respiratory Disease of Cattle, *Can. J. comp. Med*, 46, 225-263, 1982
- Zhiqiang Song, Yuan Li, Yang Liu, Jiuqing Xin, Xiaohui Zou, Wenjing Sun, a-Enolase, an Adhesion-Related Factor of *Mycoplasma bovis*, *PLoS ONE*, 7, 1-6, 2012
- FAO 2014 PRODUCCIÓN DE LECHE <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/leche-y-productos-lacteos/es/#.Uuhwre2FBIY>
- <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/produccion-lechera/es/#.Uuh73-2FBIZ>
- http://www.lactodata.com/lactodata/docs/ind/lacto_ind_prod.pdf