



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

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

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**“ESTUDIO SEROLÓGICO Y MOLECULAR, PARA DETERMINAR LA  
PRESENCIA DE *MYCOPLASMA MYCOIDES* SUBSP. *MYCOIDES* SC, EN  
UNIDADES BOVINAS DE PRODUCCIÓN LÁCTEA”**

**TESIS**

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

**PRESENTA:**

**LOPEZ ALVARADO CUAUHEMOC**

**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. ENERO 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## INDICE GENERAL

INDICE DE CUADROS

INDICE DE FIGURAS

TABLA DE ABREVIATURAS

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

RESUMEN.....	16
ABSTRACT.....	17
1.0 INTRODUCCIÓN.....	18
1.1 Historia de <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC ( <i>MmmSC</i> ) .....	19
1.2 Distribución de la enfermedad .....	19
1.3 Susceptibilidad del hospedero .....	20
1.4 Transmisión de la enfermedad y signos clínicos.....	20
1.5 Patogénesis y patología de la enfermedad .....	21
1.6 Inmunopatogenicidad .....	22
1.7 Genoma .....	23
1.8 Factores de virulencia.....	23
1.8.1 Formación de biopelícula .....	24
1.8.2 Cápsula de galactano .....	24
1.8.3 Variabilidad antigénica.....	25
1.8.4 Proteínas de superficie .....	25

1.8.5 Producción de peróxido de hidrógeno.....	26
1.9 Requerimientos nutricionales del género <i>Mycoplasma</i> .....	27
1.10 Diagnóstico de <i>MmmSC</i> .....	27
1.11 Control de la enfermedad.....	29
2.0 JUSTIFICACIÓN .....	30
3.0 HIPOTESIS .....	31
4.0 OBJETIVOS GENERALES.....	31
4.1 Objetivos específicos.....	31
5.0 MATERIAL Y METODOS .....	32
5.1 Zona de estudio .....	32
5.2 Toma de muestra .....	32
5.3 Determinación de número de muestra .....	32
5.4 Número muestras colectadas en las diferentes entidades geográficas de estudio ..	33
5.4.1 Estado de Hidalgo .....	33
5.4.2 Estado de Aguascalientes .....	34
5.4.3 Estado de Querétaro .....	34
5.5 Metodología para el aislamiento de micoplasma .....	34
5.6 Identificación de género .....	35
5.6.1 Filtrabilidad .....	35
5.6.2 <i>No reversión de formas L</i> .....	35
5.6.3 Sensibilidad a la digitonina. ....	36

5.7 Extracción de ADN .....	36
5.8 Tipificación molecular para el determinar la especies del género <i>Mycoplasma</i> spp. ..	37
5.9 Genes empleados para la identificación molecular de <i>Mycoplasma mycoides</i> y diferentes especies de <i>Mycoplasmas</i> de importancias en unidades de producción lechera.....	37
5.10 Condiciones de la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para la identificación de especies de micoplasmas. ....	38
5.11 Identificación de <i>MmmSC</i> mediante análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de las regiones amplificadas empleando la enzima de restricción Alul.....	39
5.12 Inmunoensayo competitivo para <i>MmmSC</i> (C-ELISA).....	39
5.12.1 Procedimiento de la prueba de ELISA .....	40
5.12.2 Criterio de validación de la prueba .....	41
5.12.3 Interpretación de la prueba de C-ELISA .....	41
6.0 RESULTADOS .....	42
6.1 Aislamiento de <i>Mycoplasma</i> spp. ....	42
6.2 Aislamiento de <i>Mycoplasma</i> spp. en las diferentes entidades de estudio .....	43
6.3 Presencia de <i>Mycoplasma</i> spp. de acuerdo a la edad y signología respiratoria.....	43
6.4 Presencia de <i>Mycoplasma</i> spp. de acuerdo a la edad y signología respiratoria en las diferentes entidades de estudio.....	44
6.4.1 Estado de Hidalgo .....	44
6.4.2 Estado de Aguascalientes .....	44
6.4.3 Estado de Querétaro .....	45

6.5 Correlación de <i>Mycoplasma spp.</i> respecto a bovinos con enfermedad respiratoria y edad de los bovinos. ....	45
6.6 Tipificación molecular de diferentes especies de micoplasma. ....	46
6.7 Frecuencia de especies de micoplasma identificadas de acuerdo a la edad y grado de infección .....	49
6.8 Elisa competitiva prescrita por la OIE para detección de anticuerpos para <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>Mycoides SC</i> .....	50
6.9 Identificación molecular de <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>Mycoides SC</i> .....	51
7.0 DISCUSIÓN .....	52
7.1 Identificación de <i>Mycoplasma spp.</i> .....	52
7.2 Prevalencia de <i>Mycoplasmas mycoides</i> subsp. <i>mycoidesSC</i> .....	53
7.3 Prevalencia de <i>Mycoplasma bovis</i> .....	55
7.4 Prevalencia de <i>Mycoplasma dispar</i> .....	56
8.0 CONCLUSIONES.....	58
9.0 LITERATURA CITADA .....	60

## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1	
Muestras colectadas de hisopos nasales y suero de bovinos en 23 establos en la Cuenca lechera de Tizayuca Hgo.....	33
Cuadro 2	
Muestras colectadas de hisopos nasales y suero de bovinos en tres unidades de producción lechera en Aguascalientes.....	33
Cuadro 3	
Muestras colectadas de hisopos nasales y suero de bovinos en una unidad de producción lechera en Querétaro.....	34
Cuadro 4	
Iniciadores empleados para la tipificación molecular de diferentes especies de micoplasmas en bovinos.....	34
Cuadro 5	
Condiciones de amplificación para las diferentes especies de micoplasma.....	38
Cuadro 6	
Tamaño de los fragmentos obtenidos con la Enzima AluI sobre el gen ADN.....	39
Cuadro 7	
Distribución de controles y sueros en las placas de C-ELISA.....	41
Cuadro 8	
Aislamientos de <i>Mycoplasma spp.</i> , a partir de hisopos nasales en 23 unidades de producción de Hidalgo.....	44
Cuadro 9	
Aislamientos de <i>Mycoplasma spp.</i> , a partir de hisopos nasales en 3 unidades de producción de Aguascalientes.....	44
Cuadro 10	
Aislamientos de <i>Mycoplasma spp.</i> , a partir de hisopos nasales en una unidad de producción de Querétaro.....	45

Cuadro 11	
Correlación de <i>Mycoplasma spp.</i> y enfermedad respiratoria de los animales de estudio .....	45
Cuadro 12	
Correlación de <i>Mycoplasma spp.</i> y edad de los animales de estudio .....	46
Cuadro 13	
Frecuencia de especies de Micoplasmas con respecto a la edad y estado clínico de la enfermedad de los bovinos .....	47
Cuadro 14	
Correlación de <i>Mycoplasma spp.</i> respecto a la enfermedad respiratoria y edad de los animales de estudio .....	48

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1	
Porcentaje de animales positivos a <i>Mycoplasma</i> spp respecto al estado sanitario de los animales de estudio.....	42
Figura 2	
Porcentaje de aislamientos de <i>Mycoplasma</i> spp. En unidades de producción lechera.....	43
Figura 3	
Porcentaje de aislamientos de <i>Mycoplasma</i> spp. en relación a la edad y estado sanitario de los bovinos analizados .....	43
Figura 4	
Porcentaje de especies identificadas molecularmente mediante la PCR punto final.....	47
Figura 5	
Productos de la PCR de <i>Mycoplasma bovis</i> .....	48
Figura 6	
Productos de la PCR para <i>Mycoplasma dispar</i> .....	49
Figura 7	
Productos de la PCR para <i>Mycoplasma mycoides</i> .....	49
Figura 8	
Frecuencia de especies de micoplasmas identificadas en relación a la edad de los animales y grado de infecciónrespiratoria.....	50
Figura 9	
Placa de Elisa para <i>MmmSC</i> .....	50
Figura 10	
Producto de la digestión de la enzima Alu1 en gel de agarosa al 2%, de la PCR obtenida del grupo <i>mycoides</i> .....	51

## TABLA DE ABREVIATURAS

( - )	Negativo
( + )	Positivo
μm	Micrómetro
ng	Nanogramo (‘s)
μl	Microlitro (‘s)
Alu1	A
ARNr	Ácido Ribonucléico ribosomal
ARN	Ácido Ribonucléico
C	Citosina
G	Guanina
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de Magnesio
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> : Ácido desoxirribonucléico
DNAr	Ácido desoxirribonucléico ribosomal
DNTP	Di nucleótido-trifosfato
C-ELISA	Inmunoensayo competitivo
kb	Kilo base
SC	<i>Small colony</i> : colonia pequeña
M	Molar (soluciones molares)
NAD	Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina
°C	Grados centígrados
OPPD	Oligopéptido Permeasa
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
PBS	Solución Buffer Fosfatos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial de Hidrógeno

PPLO	Organismos Asociados a Pleuroneumonía
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación
<i>MmmSC</i>	<i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides small colony</i>
Taq	<i>Termus aquaticus</i>
PCB	Pleuroneumonía Contagiosa Bovina
Mb	Mega pares de base
<i>Mb</i>	<i>Mycoplasma bovis</i>
<i>Md</i>	<i>Mycoplasma dispar</i>
FC	Fijación del complemento
mm	Milímetros
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
Pb	Pares de bases
LppA	Lipoproteína A
LppB	Lipoproteína B
LppC	Lipoproteína C
LppQ	Lipoproteína Q
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
R.P.M.	Revoluciones por minuto
<i>g</i>	Gravitaciones
IgG	Inmunoglobulina G
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	ácido sulfúrico
PI	Porcentaje de inhibición
OD	Densidad óptica
Cm	Control monoclonal
CC	Control de conjugado
CN	Control negativo

CP++	Control fuertemente positivo
CP+	Control debilmente positivo
TMB	Tetrametilbenzidina
TAE	<u>Tris</u> , <u>Acetato</u> y <u>EDTA</u> ,
Vmm	Proteína variable de <i>M. mycoides</i>

## **DEDICATORIA**

A DIOS,

Doy gracias por la vida, por estar conmigo en cada paso poner en mi camino a aquellas personas que han sido soporte y compañía en mi vida.

A MIS PADRES

Por haberme dado la vida, a mi padre por su gran apoyo en el momento que mas lo necesite y a mi madre (†) con todo mi corazón porque aun con el paso del tiempo, siguen en mis recuerdos el gran amor que me tuviste, siempre te llevare en mi corazón.

A MI ESPOSA, LORENA.

Gracias, por tu compañía, tu gran amor y paciencia ya que ambos sabemos el sacrificio que padecemos en este proceso, ahora puedo decir que esta tesis lleva mucho de ti. Te amo.

A MIS HIJAS REBECA Y SINAI

Porque llegaron a nuestras vidas como una bendición de dios en el momento preciso, para llenarnos de su amor y alegría.

A MIS HERMANOS

Con mucho cariño a mis hermanos. María de Jesús, Edith y Judith, Virgilio, Antonia, Marco Antonio, Rogelio, Pedro, a pesar del poco tiempo compartido, están en mi corazón y se que siempre contare con ustedes en todo momento.

A MIS SUEGROS

Con admiración y respeto, por el apoyo que me han brindado y por ser de las personas con un gran corazón y que dan lo mejor de si mismo sin esperar nada a cambio.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la doctora Rosa Elena Miranda Morales, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por sus consejos y enseñanzas que realmente me han ayudado mucho en mi desarrollo profesional, muchas gracias.

A los miembros de mi comité tutor, Doctor Francisco Trigo Tavera y a la Doctora Laura Jaramillo Meza., gracias por su tiempo y asesoramiento en este proyecto.

Con cariño y especial agradecimiento a mis compañeros del laboratorio de Micoplasmas, Verónica Rojas, Marlenne Maya, Fabiola Ávila, Martha Juárez, Ulises Nader, Tania Molina y Liliana Tapia, por su gran apoyo y enseñanza en este proyecto.

Gracias al apoyo de Beca CONACYT, al proyecto PAPITT IN- 222412-3 y PAPITT IN-219909-3, por el financiamiento de este proyecto.



## Resumen

LÓPEZ ALVARADO CUAUHTÉMOC Estudio serológico y molecular, para determinar la presencia de *Mycoplasma Mycoides* subsp. *Mycoides* SC, en unidades bovinas de producción láctea (Bajo la dirección de la Dra. Rosa Elena Miranda Morales, M en C. Laura Jaramillo Meza y Dr. Francisco J. Trigo Tavera).

*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. es el agente etiológico de la Pleuroneumonía Contagiosa Bovina (PCB), una enfermedad respiratoria altamente contagiosa en el ganado bovino, que se encuentra clasificada en la lista A de la OIE, así mismo, está dentro de la lista de enfermedades exóticas de reporte obligatorio emitida por el Diario Oficial de la Federación de México en septiembre del 2007. Un total de 760 muestras de sueros e hisopos nasales fueron colectados de forma aleatoria de hembras de diferentes edades de la raza Holstein Friesian, en unidades en producción láctea con antecedentes de problemas respiratorios, en diferentes entidades geográficas de México, con la finalidad de aislar el agente e identificar anticuerpos contra *Mycoplasma Mycoides* subsp. *Mycoides* SC., para lo cual se utilizó un sistema diagnóstico de ELISA competitiva (C-ELISA), recomendado por la OIE y las muestras nasales fueron inoculadas en medio de cultivo de Hayflick. Las positivas a micoplasma, fueron tipificadas molecularmente mediante PCR punto final. Los resultados obtenidos mediante la (C-ELISA) no mostraron animales seropositivos a PCB; así mismo, el microorganismo no fue identificado mediante el aislamiento y molecularmente, por lo tanto, las especies identificadas de mayor a menor fueron *M. bovis* en 96 (44%), seguida de *M. dispar* en 45 (21%), *M. mycoides* 22 (10%), y 54 (25%) solo identificadas por el género *Mycoplasma spp.* *M. bovis* fue el patógeno más comúnmente identificado, principalmente en terneros que presentaban neumonías 34 (35%), mediante la prueba no paramétrica de Spearman, se pudo observar una correlación entre la sinología respiratoria y *M. bovis*, donde el valor calculado con un Rho de (.136), y respecto a la edad un Rho de (.178).

## Abstract

*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. is the etiological agent of contagious bovine pleuropneumonia (PCB), a highly contagious respiratory disease in cattle, which is classified in the List A of the OIE, itself, is on the list of exotic diseases of mandatory reporting issued by the Daily Official News of the Government of Mexico in September 2007. A total of 760 sera samples and nasal swabs were collected randomly in females at different ages of the Holstein Friesian breed in units in milk production with a history of respiratory problems in different Mexican geographical areas, in order to isolate agent and identify antibodies of *Mycoplasma mycoides* subsp. *Mycoides* SC. It was used a commercial kit competitive ELISA (C-ELISA), prescribed by the OIE and nasal samples were inoculated into culture medium Hayflick. Positive sample for micoplasma were typified by PCR molecular endpoint. The results obtained using the (C-ELISA) showed no seropositive animals to Pleuroneumonia Contagious Bovine (PBC), likewise the microorganism was not identified by the isolation and molecularly techniques. Identified species were as follows: *M. bovis* in 96 (44%), followed by *M. dispar* in 45 (21%), *M. mycoides* 22 (10%), and 54 (25%) only identified by the genus *Mycoplasma* spp. The most common pathogen identified was *M. bovis*, mainly in calves wich presented pneumonias 34 (35%). By Spearman nonparametric test, it was observed a correlation between respiratory signology and *M. bovis*, where the calculated value was less than .000 critical value of  $P < 0.05$  with Rho (.136), and with respect to the age of one Rho (.178).

## I.0 Introducción

Las enfermedades respiratorias representan la causa más común de pérdidas económicas a la ganadería nacional, su presentación es favorecida por diversos factores estresantes medio ambientales, como son el hacinamiento, mezcla de animales de diferentes tamaños y edades, calor o frío excesivo, elevada humedad relativa, transportes prolongados, instalaciones con ventilación deficiente, cambios bruscos de alimentación y la alta demanda productiva, los cuales de manera individual o en combinación afectan las defensas pulmonares del hospedero, favoreciendo el establecimiento de microorganismos patógenos, virus, bacterias y hongos. Los micoplasmas son microorganismos que carecen de pared celular por lo que son resistentes a antibióticos  $\beta$ -lactámicos; para su desarrollo requieren de esteroides que les confieren una mayor estabilidad de su membrana plasmática, los cuales adquieren bajo condiciones naturales en forma de colesterol de los animales que parasita. Su tamaño oscila entre 0.3 a 0.9  $\mu\text{m}$ , debido a su pequeño genoma (0.58-2.20 Mb en comparación con los 4.64 Mb de *Escherichia coli*), tienen una limitada capacidad de biosíntesis dándoles la característica de ser parásitos obligados (Ramírez, 1978, Razin *et al.*, 1998, Rottem y Yogev, 2000, Rottem 2003).

Las principales especies de micoplasmas que causan enfermedades de gran relevancia mundial en las unidades de producción bovina son *M. bovis* (*Mb*) *M. dispar* (*Md*) y Micoplasmas del grupo *mycoides* como son *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (*MmmSC*), *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* y *Mycoplasma leachii* (Ayling *et al.*, 2004, Thomas *et al.*, 2002, Manso-Silvan *et al.*, 2009).

*MmmSC* es el agente etiológico de la Pleuroneumonía Contagiosa Bovina (PCB), una enfermedad respiratoria altamente contagiosa en el ganado bovino y desde 2004 se encuentra en la lista A de la OIE (Nicholas, 2009). En México desde septiembre del 2007 está clasificada en la lista de enfermedades exóticas de reporte obligatorio, emitida por el Diario Oficial de la Federación. La enfermedad es de importancia económica por la alta morbilidad y mortalidad que causa en el ganado, esto conllevó a

generar normas internacionales por parte de la OIE y restricciones para la exportación de ganado (OIE,2008).

### **1.1 Historia de *MmmSC***

La *MmmSC* fue cultivada y caracterizado por primera vez por Nocard y Roux en 1898 (Bove, 1999). Fue registrada por primera vez en Europa y fue introducida en África, América del Norte, Australia y Nueva Zelanda durante los siglos 18 y 19 a través de los movimientos de ganado (Fisher, 2006). Hoy en día, la PCB está presente solo en países África y Asia.

### **1.2 Distribución de la enfermedad**

La OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) reporta la PCB solo en países africanos de África Oriental, Central y Occidental, como enfermedad epidémica o, en forma endémica, dependiendo del país, actualmente se considera uno de los principales obstáculos para el crecimiento de la industria ganadera en el Continente Africano, ocasiona pérdidas económicas anuales directamente o indirectamente estimadas en 2 billones de dólares estadounidenses (Miltiadou *et al.*, 2009, Food and Agriculture Organization of the united nations, 2004). En países endémicos del suroeste de Europa como España, Portugal, Italia y Francia no se han reportado casos de la enfermedad desde los 90s (Nicholas *et al.*, 2009). Australia y Nueva Zelanda son libres desde 1967, Estados Unidos y Canadá por más de 100 años. En países asiáticos la ocurrencia de la PCB, se ha informado en algunos países como Kuwait en el 2006, en China se ha obtenido poca información, sin embargo; en el 2007, se identificaron algunos animales seropositivos mediante las pruebas de Fijación en complemento (FC) y ELISA competitiva (C-ELISA) en el Tíbet, Yunnan y Guizhou (Xin *et al.*, 2007). En México mediante pruebas diagnósticas específicas prescritas por la OIE, no ha sido identificada la presencia de la enfermedad (SAGARPA 2008).

### **1.3 Susceptibilidad del hospedero**

El ganado bovino es el hospedero principal para *MmmSC*; no obstante, existen reportes de la enfermedad en búfalos asiático (*Bubalus bubalis*), bisontes cautivos (*Bison bison*), yaks (*Poephagus grunniens*), ovejas (*Ovis aries*) y cabras (*Capra aegagrus hircus*) (Brandão, 1995, Gonçalves *et al.*, 2002). Ovejas con mastitis y cabras con neumonía, presentaron tos leve y a la necropsia una neumonía intersticial y engrosamiento de los septos pulmonar (Brandão, 1995, Gonçalves *et al.*, 2002).

### **1.4 Transmisión de la enfermedad y signos clínicos**

*MmmSC* se transmite principalmente de un animal a otro por aerosoles. En general se cree que es necesario el contacto directo y repetido para la transmisión; sin embargo, puede propagarse a largas distancias si las condiciones climáticas son favorables.

Este agente también aparece en la saliva, orina, membranas fetales y en las descargas uterinas. Los animales portadores, como el ganado bovino infectado de forma subclínica, pueden retener organismos viables en las lesiones pulmonares encapsuladas llamadas secuestros y eliminar el agente especialmente cuando cursan por un periodo de estrés (Regalla *et al.*, 1996).

El período medio de incubación natural de la enfermedad es de 1 a 2 meses, pero puede presentarse desde la tercera semana hasta los 4 meses. En relación a ello, existe un informe de Namibia señalando que bovinos pertenecientes a un hato libre de PCB al estar en contacto con bovinos naturalmente afectados, se infectaron y la signología propia de la enfermedad se observó 6 semanas después de ocurrido el contagio; la mortalidad se presentó a las 2 semanas después de ocurrido el brote, con un reporte del 40% (Hubschle *et al.*, 2006).

Los animales infectados por *MmmSC*, pueden presentar un cuadro hiperagudo, agudo, subagudo, crónico y subclínico. Algunos bovinos pueden morir de forma hiperaguda sin mostrar signos, salvo fiebre. Los casos agudos en el ganado bovino se caracterizan por fiebre, pérdida del apetito, depresión y caída en la producción de leche, seguido por signos respiratorios con tos, descargas nasales purulentas o

mucoides y aumento en la respiración que progresa hasta convertirse en disnea. Los animales gravemente afectados generalmente se incorporan con la cabeza y el cuello extendidos, las patas delanteras separadas y respiran por la boca. La respiración puede ser dolorosa, y los animales pueden presentar dolor intenso, si se les palpa entre las costillas. Se ha observado epistaxis y signos diarreicos. Algunos animales abortan o tienen mortinatos. En terneros de hasta 6 meses de edad, la enfermedad respiratoria puede estar acompañada por poliartritis; las articulaciones carpal y tarsal, pueden inflamarse. Las articulaciones afectadas pueden presentar mucho dolor, lo que es evidente cuando el animal se rehúsa a flexionarlas. El ganado bovino afectado en forma grave generalmente muere dentro de las 3 semanas. Los que se recuperan presentan emaciación y debilitamiento y pueden adquirir la forma crónica (Provost *et al.*, 1987, Scacchia *et al.*, 2011). Los signos clínicos subagudos son similares a un cuadro agudo, pero más leves y estas infecciones generalmente, se hacen crónicas. Los casos crónicos se caracterizan por fiebre, pérdida de la condición y signos respiratorios que pueden observarse cuando el animal está en ejercicio (Regalla *et al.*, 1996). El uso de antibióticos puede ayudar a enmascarar los signos clínicos en los bovinos infectados. En África, se estima que hasta un tercio de los casos al recuperarse de la enfermedad se convierten en portadores potenciales (Nicholas *et al.*, 2000, Hubschle, 2006).

### **1.5 Patogénesis y patología de la enfermedad**

El agente penetra por mucosas respiratorias. Se multiplica lentamente en el epitelio bronquial, bronquiolar y alveolar, produciendo inflamación que se difunde en tejido pulmonar. Puede pasar a vasos sanguíneos y linfáticos, una vez en el tejido intersticial localizarse en pleura, mediastino y linfonodos regionales, provoca trombos en el sistema linfático, donde las lesiones se desarrollan primero, como consecuencia de ello, la linfa se coagula con distensión de los septos interlobulares e infiltración de linfocitos y células plasmáticas alrededor de los vasos sanguíneos. La formación de esta lesión es la única característica patognomónica de PCB. La lesión secundaria

implica a los alvéolos, presentando necrosis rodeada de granulocitos polimorfonucleares, convirtiéndose en secuestros si las lesiones tienen una resolución crónica. Gran cantidad de líquido pleural de color paja se puede encontrar en la cavidad torácica en casos agudos, los septos interlobulares a menudo se encuentran distendidos, los pulmones presentan un aspecto de marmoleo, presentado variaciones de color de rojo, gris o amarillo. En casos crónicos el secuestro es el tipo de lesión principal y consta de material necrótico rodeado por una cápsula fibrótica que fluctúa desde 10 a 100 mm de diámetro, estos focos necróticos también han sido reportados en riñones y en pericardio en casos severos. Histológicamente las lesiones de la PCB comprenden una necrosis bronquiolar y edema, progresando rápidamente a una bronquiolitis con exudado serofibrinoso extendiéndose hacia los alveolos y vasos linfáticos (Done *et al.*, 1995). Estos alcanzan rápidamente la saturación y el proceso se extiende a los linfonodos tráqueo bronquiales y linfa pleural. Los linfonodos mediastínicos, esternales, aórticos e intercostales pueden estar aumentados de tamaño, edematosos y hemorrágicos. Debido a la estasis, los vasos linfáticos presentan trombos fibrinosos, los lóbulos pulmonares se consolidan con edema alveolar, fibrina y células inflamatorias (Nicholas *et al.*, 2000, Provost *et al.*, 1987, Scacchia *et al.*, 2011).

### **1.6 Inmunopatogenicidad**

La consecuencia patológica de la *MmmSC*, es una reacción inflamatoria masiva en su mayoría restringida a los pulmones de los bovinos. La muerte es causada por insuficiencia respiratoria debida por una consolidación pulmonar. Sin embargo en la mayoría de los animales afectados, el cuadro de la PBC se manifiesta en forma crónica, permitiendo a los animales recuperarse de la enfermedad, siendo estos portadores potenciales del patógeno (Provost *et al.*, 1987; Food and Agriculture Organization, 2003).

En un estudio realizado para comprender los mecanismos de resistencia inmune entre los efectos agudos y crónicos, de la PCB en el ganado bovino, demostraron que los

animales que se recuperaron de la enfermedad, los linfocitos T cooperadores o CD4 (Th1), segregaron niveles significativos de interferón gamma. Por el contrario, en los animales que desarrollaron un cuadro agudo, las células mononucleares fueron deficientes para producir el interferón. Estos datos indicaron que en la susceptibilidad a la infección causada por *MmmSC* está asociada con la capacidad del hospedador para montar una respuesta inmune (Dedieu *et al.*, 2005). Se ha demostrado que *MmmSC* es capaz de inducir el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) en los macrófagos alveolares. El TNF- $\alpha$  actúa como un mediador inflamatorio expresado por NF- $\kappa$ B, pueden actuar como señales principales que inducen la apoptosis en las células huésped (Jungi *et al.*, 1996).

### **1.7 Genoma**

El estudio del genoma de la cepa tipo PG1, indica que es un único cromosoma circular de 1,211,703 pb con bajo contenido de G + C (24 mol %) y con alta densidad de secuencias de inserción (13% del tamaño del genoma). El genoma contiene 965 genes, con una longitud media de 982 pb. El 59% de éstos están asociados a alguna función; mientras que, el 27% son únicos para *MmmSC* y el 14% tienen una función desconocida, pero muestran una homología significativa a los genes de otras especies de *Mycoplasma* (Westberg *et al.*, 2004). Sin embargo debido a que la PG1 es una cepa de referencia avirulenta, limitaba la comprensión de cepas patógenas; por lo tanto se reportó la secuencia del genoma completo de la cepa virulenta Gladyslade, teniendo un genoma circular de 1,193,808 pb ligeramente más pequeño que la cepa PG1, solo diferenciándose de la cepa PG1a una variación en el número de copias en un bloque de genes, probablemente y por múltiples polimorfismos de nucleótidos dispersos a lo largo del cromosoma (Kim *et al.*, 2012).

### **1.8 Factores de virulencia**

Una amplia variedad de posibles factores de virulencia han sido identificados, incluyendo genes que codifican para proteínas variables de superficie, enzimas transportadoras responsables de la producción de peróxido de hidrógeno, así como de

la producción de la cápsula de galactano. Esto le permite al agente tener la capacidad de evadir la respuesta inmune, adherirse, causar efectos tóxicos y difundirse en las células del hospedador, así como secretar los productos metabólicos tóxicos a la célula huésped, causándole efectos citotóxicos.

### **1.8.1 Formación de biopelícula**

Las biopelículas bacterianas constituyen una matriz extracelular compuesta básicamente de polisacáridos, donde las células bacterianas se adhieren a una superficie y forman una comunidad, confiriéndoles protección al medio ambiente adverso que les rodea y a los mecanismos microbicidas, es un factor importante en la iniciación de la enfermedad y la persistencia de muchas especies bacterianas. En un estudio donde se emplearon diferentes especies de *Micoplasmas*, se encontró una variación considerable en su capacidad para formar biopelícula. *M. putrefaciens*, *M. cottewii*, *M. yeatsii*, *M. agalactiae* y *M. bovis* produjeron abundante biopelícula. Por el contrario *MmmSC* fue incapaz de formar biopelícula (McAuliffe *et al.*, 2006). Sin embargo en un estudio más reciente con diferentes cepas de *MmmSC*, algunas de ellas tuvieron la capacidad de formarlo (McAuliffe *et al.*, 2008).

### **1.8.2 Cápsula de galactano**

Es una capa de oligosacárido que rodea la membrana celular, le confiere al microorganismo la capacidad de evadir la fagocitosis, adherirse a la célula huésped, permitiéndole persistir y diseminarse, además de tener un efecto tóxico directo sobre las células del hospedero. Se ha propuesto que un complejo autoinmune se forma como resultado de una respuesta contra el pneumogalactano del tejido pulmonar, estimulado por la reacción de galactano producida por el micoplasma; esto provoca trombos en el sistema linfático, donde inician las lesiones. Como consecuencia de ello, la linfa se coagula con distensión de los septos interlobulillares e infiltración de linfocitos y células plasmáticas alrededor de los vasos sanguíneos (March y Brodli 2000). Se demostró que la inyección intravenosa de galactano de *MmmSC*, en

terneros producía apnea transitoria, aumento de la presión arterial pulmonar y edema pulmonar, lo que indica que el polisacárido de esta especie, tiene un efecto citopático directo y parece conducir a la contracción de los vasos sanguíneos, pudiendo iniciar una trombosis (Buttery *et al.*, 1976).

### **1.8.3 Variabilidad antigénica**

*MmmSC* es capaz de alternar su composición de proteínas de superficie, fenómeno llamado variación antigénica, con el fin de evadir la respuesta inmune, promover su colonización y adaptarse al tejido del hospedero en las distintas etapas de la infección. Poseen un sistema de encendido y apagado para activar o inactivar genes (Minion, 2012). En este microorganismo se ha identificado y caracterizado una proteína de superficie, la cual posee variación de fase reversible, con una tasa de cambio de  $9 \times 10^{-4}$  a  $5 \times 10^{-5}$  por célula. Se demostró que el gen *vmm* codifica una lipoproteína precursora de 59 aminoácidos, (aa), en tanto que, la proteína madura está constituida por solo 36 aa con anclaje a la membrana citoplasmática. Genes semejantes al gen *vmm* se han identificado en cuatro especies de micoplasmas estrechamente relacionados: *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*, *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae*, *Mycoplasma leachii* (*Mycoplasma sp.* serogrupo 7 bovino) y *Mycoplasma putrefaciens*. Sin embargo, la detección de la proteína en lisados celulares de estas especies mediante el uso del anticuerpo monoclonal MAb 5G1 con afinidad a la Vmm, no pudo lograrse; lo cual, de acuerdo a Pearson y colaboradores puede tener dos explicaciones, una que en las proteínas codificadas por los genes de *vmm* de estas especies falta el epitopo vinculante para el anticuerpo monoclonal utilizado, o bien que las proteínas Vmm no se expresan pese a la presencia de los genes que las codifican (Sachse *et al.*, 2000, Persson *et al.*, 2002).

### **1.8.4 Proteínas de superficie**

Las lipoproteínas son macromoléculas de la membrana altamente antigénicas, desempeñando un papel central en la interacción del microorganismo y célula

eucariota, desencadenando mecanismos de patogenicidad con respecto a la adhesión, y estímulo de citocinas pro-inflamatorias (Belloy *et al.*, 2003).

La LppA; es altamente conservada entre micoplasmas del grupo *mycoides* y se expresa en especies altamente virulentas; así como en especies poco virulentas (Monnerat *et al.*, 1999). La LppB; es encontrada en cepas de *MmmSC*, aisladas en África y Australia (Vilei *et al.*, 2000), sin embargo, también está presente en otros micoplasmas del grupo *mycoides*, en particular con *Mycoplasma* sp. Grupo 7 bovino. La LppC; es expresada, en todas las cepas *MmmSC*, encontrándose también en otras especies de micoplasma.

La LppQ; es específica de *MmmSC*, aislándose en cepas de campo de Europa, África y Australia, es altamente antigénica en el dominio N-terminal, mientras su dominio C-terminal se encuentra anclada en la membrana (Belloy *et al.*, 2003, Pilo *et al.*, 2003).

#### **1.8.5 Producción de peróxido de hidrógeno**

El consumo de oxígeno y la producción de superóxido y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) se han identificado como características particulares de *MmmSC*, siendo éste último un potente factor de virulencia. El contacto íntimo del microorganismo, con la membrana epitelial ciliada del hospedador facilita la liberación directa del  $H_2O_2$ , causando pérdida de la actividad de los cilios y la destrucción final de la capa epitelial, induciendo un proceso inflamatorio. Comparando con cepas europeas, las cepas africanas y australianas, producen mayores cantidades de  $H_2O_2$  mediante la oxidación del glicerol; genéticamente la diferencia entre las cepas, se encuentra en un segmento de 8,84 kb que incluye los genes *gts ABC*, que codifica un sistema de unión a ATP para la absorción y transporte activo del glicerol (Daniela *et al.*, 2008). En la cepa PG1 de *MmmSC*, se encontraron dos grupos de genes que están involucrados en el transporte de glicerol y producción de  $H_2O_2$ . El primer grupo contenía, los genes ***glpO***, ***glpK***, y ***glpF***, que codifican para glicerol-3-fosfato oxidasa (*GlpO*), glicerol kinasa (*GlpK*) y un captador de glicerol (*GlpF*). El glicerol es captado por *GlpF*, es fosforilado por *GlpK* y posteriormente se convierte en dihidroxiacetona fosfato y  $H_2O_2$

por *GlpO*. Los genes del segundo grupo (*gtsA*, *gtsB* y *gtsC*) codifican las proteínas transportadores ABC involucrados en el transporte de glicerol (Vilei *et al.*, 2000).

### **1.9 Requerimientos nutricionales del género *Mycoplasma***

Los micoplasmas son exigentes en sus requerimientos nutritivos. El medio de cultivo se basa generalmente en la Infusión de corazón de bovino y extracto de levadura que proporcionan una variedad de nutrientes, incluyendo nucleótidos, vitaminas, sales minerales, ADN y la coenzima NADH, favoreciendo su crecimiento mediante las reacciones redox (oxido-reducción), llevando electrones de una reacción a otra en los procesos metabólicos (Miles, 1992). El suero de animales (ternero, caballo, cerdo) es empleado por el microorganismo como fuente esencial de lípidos (Razin, 1991). La oxidación de glicerol es muy importante para la síntesis de glicofosfolípidos y glicéridos. Las peptonas proporcionan al medio dipéptido, polipéptidos, y aminoácidos (Miles, 1992). La glucosa es la principal fuente de energía en los micoplasmas fermentativos, así como fuente de carbono para la síntesis de otros azúcares y polisacáridos (Razin y Freundt 1984). Debido a que carecen de una pared celular, son más susceptibles a la lisis en medios de cultivos hiposmóticos, por lo que necesitan de cloruro de sodio, para aumentar la tonicidad del medio, requiriendo una presión osmótica de 7–14 atmósferas para su crecimiento, y un pH entre 7 y 8, siendo un pH óptimo de 7.8. Son muy sensibles a cualquier cambio de pH, por lo que una disminución a 6.5, debido a la fermentación de azúcar, limita su crecimiento, conduciendo a la muerte celular; un aumento en el pH por encima de 8.0 puede también conducir a lisis celular. Son necesarios inhibidores del crecimiento como penicilina, colistina o acetato de talio, para evitar el crecimiento de otras bacterias (Rodwell *et al.*, 1979).

### **1.10 Diagnóstico de *MmmSC***

*MmmSC*, puede ser aislado de muestras de animales vivos a partir de hisopos nasales, lavados broncoalveolares y líquido pleural, a la necropsia de lesiones

pulmones se puede obtener líquido pleural, linfonódulos y líquido sinovial de animales con artritis (Thomas *et al.*, 2002). Actualmente, las técnicas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han resultado ser más conveniente para el diagnóstico rápido y asertivo, además poseen alta sensibilidad y especificidad. Se han descrito cebadores específicos para el grupo de *Mycoplasma mycoides* y para *MmmSC*. así como ensayos de PCR que pueden diferenciar las cepas de europeas, africanas y australianas. (McAuliffe *et al.*, 2005).

Se pueden identificar antígenos en tejidos o líquidos con inmunofluorescencia e inmunodifusión en gel de agar. Un estudio sugirió que la detección del antígeno puede dar mejores resultados que el cultivo de muestras de linfonódulos. Generalmente se utiliza la serología para hatos en programas de vigilancia y erradicación más que para diagnosticar animales de manera individual. Las pruebas serológicas incluyen la prueba de fijación del complemento FC modificada de Campbell y Turner, esta prueba continúa siendo el referente de diagnóstico prescrito para el comercio internacional (Marobela-Raborokgwe *et al.*, 2003). Se puede utilizar una prueba de aglutinación rápida en portaobjeto (SAT) con sangre entera o suero, sin embargo esta prueba sólo puede identificar animales en la etapa aguda de la enfermedad. Se ha considerado una C-ELISA, como una prueba alternativa por el comité internacional de la OIE en mayo de 2000 y como una prueba prescrita por la OIE para el comercio internacional en el 2004. En un estudio comparando las pruebas mediante lesiones posmortem características de PCB, la sensibilidad de la C-ELISA fue de 97,8%., categorizándola por etapas de la enfermedad, en la etapa de inicio de la enfermedad la sensibilidad fue de 67,7%, en la fase aguda 94,6% en la fase crónica de la infección fue de 83,5%. Cuando se analizaron 202 sueros libres de PCB utilizando esta prueba, 3 muestras de 202 resultaron positivas dando una especificidad de la prueba para ser 98,5%. La FC mostró una sensibilidad del 78.8%, detectando el mayor número de animales positivos en el estado agudo de la enfermedad; sin embargo, la especificidad fue del 100%.

### **1.11 Control de la enfermedad**

El control de la PCB se logra eliminando toda la población de bovinos donde se detecta la enfermedad, mediante el sacrificio sanitario., sin embargo, esto puede no resultar realista, y la cuarentena junto con la vacunación contra la enfermedad son las medida de control más empleadas. Para que la vacunación sea eficaz, debe ser inmunizado el 100% del ganado dentro de un área epidemiológica y geográficamente definida. La vacunación debe ser repetida, en un principio, a intervalos cortos y después, anualmente durante varios años, es decir, no menos de 3 a 5 años. Esta vacunación deberá mantenerse hasta que la evidencia de erradicación de la PCB no sea demostrada mediante una vigilancia estructurada. La cepa vacunal atenuada (cepa T1) se usa ampliamente en África, y sólo aquellos con certificación de aseguramiento de la calidad se deben utilizar. El control de calidad de la vacuna es, por lo tanto, un componente esencial de los programas de control de la PCB (OIE 2008).

## 2.0 Justificación

La PCB es altamente contagiosa y los brotes ocurren principalmente cuando ingresa ganado infectado a unidades de producción, por lo tanto el riesgo de presentarse la enfermedad es alta, ya que México es potencialmente importador de ganado de ganado de reemplazo, representado el 1.63 por ciento a nivel mundial. Durante el 2010, México registro un volumen de importación de ganado en pie de más de 90,000 cabezas (SAGARPA, 2010), por lo que el país, debe de poner atención permanente, a la vigilancia y al diagnóstico de la enfermedad de animales que se importan al país, así como considerarse en hatos que presente casos recurrentes de enfermedad respiratoria por medio de pruebas recomendadas por la OIE, como son el cultivo bacteriano que puede ser realizado de muestras de animales vivos a partir de hisopos nasales, lavados broncoalveolares y líquido pleural, a la necropsia de lesiones pulmones se puede obtener líquido pleural, nódulos linfáticos y líquido sinovial de animales con artritis seguida de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que es sensible y muy específica para determinar la identificación del microorganismo (Thomas *et al.*, 2002). Es recomendada la serología para hatos en programas de vigilancia y erradicación más que para el diagnóstico individual. Las pruebas serológicas incluyen la prueba de fijación del complemento modificada de Campbell y Turner esta prueba continúa siendo el referente de diagnóstico para el comercio internacional (Marobela-Raborokgwe *et al.*, 2003). La C-ELISA también es recomendada como una prueba alternativa por el comité internacional de la OIE en mayo de 2000, por lo tanto para el presente estudio para la identificación de anticuerpos contra *MmmSC* fue empleado el kit de ELISA competitiva (C-ELISA), prescrito por la OIE por lo que en el presente estudio se realizó la detección de anticuerpos el kit de ELISA competitiva (C-ELISA) contra *MmmSC*, prescrito por la OIE, así como el aislamiento bacteriano de muestras de hisopos nasales y la tipificación molecular de especies de micoplasmas asociados con la PCB.

### **3.0 Hipótesis**

En México existen unidades de producción láctea, que presentan casos de enfermedades respiratorias en ganado bovino lechero, causadas por *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC.

### **4.0 Objetivo general**

Determinar la presencia de *Mycoplasma mycoides* subsp. *Mycoides* SC, en bovinos con problemas respiratorios en unidades de producción lechera.

### **4.1 Objetivos específicos**

- Efectuar el aislamiento bacteriológico y la reacción en Cadena de la Polimerasa punto final, para la identificación de *Mmm*SC.
  
- .Determinar mediante un inmunoensayo competitivo (C-ELISA), la presencia de anticuerpos contra *Mmm*SC en los bovinos muestreados.

## 5.0 Material y métodos

### 5.1 Zona de estudio

Un total de 760 muestras de sueros e hisopos nasales fueron colectadas de forma aleatoria en hembras en diferentes edades de la raza Holstein Friesian, en unidades en producción láctea de los estados de Hidalgo, Aguascalientes y Querétaro con antecedentes de problemas respiratorios.

### 5.2 Toma de muestra

Los hisopos nasales fueron transportados y conservados en medio de cultivo de Hayflick. La sangre fue obtenida a través de la punción de la vena yugular y recolectada en tubos vacutainer estériles de 6 ml; para la obtención del suero los tubos fueron centrifugados a 3,000 r.p.m. durante 5 minutos. Las muestras colectadas se almacenaron en congelación a -20°C; hasta realizar el cultivo y la prueba de C-ELISA.

### 5.3 Determinación de número de muestra

Para determinar el número de muestra, se utilizó la fórmula de población finita descrita por Daniel, 2004.

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

**n**= Número mínimo de muestra.

**N**= Total de la población.

**Z<sub>α</sub>**<sup>2</sup> = 1.96<sup>2</sup> (Seguridad del 95 %).

**P**= Proporción esperada (en este caso el 5% = 0.05).

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

**d**= Precisión (0.03)<sup>2</sup>

El número total de muestras, fue determinado estratificando las poblaciones analizadas por edad y entidad geográfica. Como se muestra en el ejemplo:

Poblacion total de 700 becerras pertenecientes a 8 unidades de produccion de la cuenca lechera de Tizayuca Hidalgo.

$$n = \frac{700 * (1.96)^2 * (0.05) * (0.95)}{(0.03)^2 * (699 - 1) + (1.96)^2 * (0.05) * (0.95)} = \frac{127.68}{.8115} = 157.3$$

#### 5.4 Número muestras colectadas en las diferentes entidades geográficas de estudio

##### 5.4.1 Estado de Hidalgo.

Fueron colectadas 356 muestras de 23 hatos de bovinos lecheros en diferentes etapas zootécnicas que sumaban una población de 7,700 animales de los cuales 158 (44%) animales muestreados presentaban afecciones respiratorias (Cuadro 1).

Cuadro 1. Muestras colectadas de 23 establos en la Cuenca lechera de Tizayuca Hgo.

<i>Edades</i>	<i>Número animales muestreados</i>	<i>Animales clínicamente sanos</i>	<i>Animales con afecciones respiratorias</i>	<i>Poblaciones Muestreadas</i>	<i>Identificación de establo</i>	<i>Total de animales</i>
<b>1 a 240 días</b>	157	91 (58%)	66 (42%)	8	E1,E2,E3, E4, E5, E6,E7,E8	700
<b>Más de 2 años</b>	199	107(54%)	92(46%)	15	-	7000
<b>Total</b>	356	198 (56%)	158 (44%)	23	-	7700

E= Establo

##### 5.4.2 Estado de Aguascalientes.

Se obtuvieron 276 muestras de hembras en diferentes etapas productivas, de las muestras colectadas 111 (40%) presentaban problemas respiratorios en una población total de 560 animales. Los establos seleccionados fueron 3 complejos lecheros con problemas de enfermedad respiratoria, antecedentes de *Mycoplasma spp.* e importación de ganado como remplazo procedente de Estados Unidos y Australia (Cuadro 2).

Cuadro 2. Muestras colectadas de tres unidades de producción lechera en Aguascalientes.

<i>Edades</i>	<i>Número animales muestreados</i>	<i>Animales clínicamente sanos</i>	<i>Animales con afecciones respiratorias</i>	<i>Poblaciones muestreadas</i>	<i>Identificación de establo</i>	<i>Total de animales</i>
<b>90 a 240 días</b>	204	110 (54%)	94(46%)	2	Establo 1, 2	450
<b>Más de 2 años</b>	72	55(76%)	17(24%)	1	Establo 3	110
<b>Total</b>	276	165(60%)	111(40%)	3	-	560

### 5.4.3 Estado de Querétaro

Se tomaron 128 muestras de vaquillas de un año y vacas a partir de 2 años de edad, en una unidad de producción de leche del total de muestras colectadas 33 (26%) animales presentaban signos respiratorios (cuadro 3).

Cuadro 3. Muestras colectadas en una unidad de producción lechera en Querétaro.

<i>Edades</i>	<i>Número animales muestreados</i>	<i>Animales clínicamente sanos</i>	<i>Animales con afecciones respiratorias</i>	<i>Poblaciones muestreadas</i>	<i>Identificación de establo</i>	<i>Total de animales</i>
<b>Vaquillas de un año</b>	24	16(54%)	8(46%)	-	Querétaro	80
<b>Más de 2 años</b>	104	79(76%)	25(24%)	-	Querétaro	280
<b>Total</b>	128	95(60%)	33(40%)	1	-	360

### 5.5 Metodología para el aislamiento de micoplasma

Se realizaron dos tratamientos para las muestras de hisopo nasal, primero del medio de transporte conteniendo el hisopado se tomaron 30 µl y se inocularon directamente en medio semisólido (0.8% de agar). El otro tratamiento consistió en tomar 200 µl del medio de transporte y transferirlo a tubos con 1.8 ml de medio líquido de Hayflick modificado (Hayflick, 1965), con lo cual se tiene una dilución  $10^{-1}$  de la muestra, de esta dilución se efectuaron diluciones decimales sucesivas hasta  $10^{-4}$ . Los cultivos se incubaron a 37 °C, en una atmósfera húmeda con un 10% de CO<sub>2</sub><sup>(2)</sup>. El medio líquido fue examinado cada 24 horas durante 5 a 7 días, para observar cambio en el pH

(cambio de color en el medio). Los cultivos que no mostraron cambio de pH se les realizó un pase ciego a los 7 días de 200 µl a 1.8 ml de medio líquido de Hayflick, este procedimiento se realizó 4 veces para interpretar el resultado como negativo. Las placas fueron inspeccionadas después de 2 a 3 días, posteriormente cada semana hasta 30 días como máximo en un microscopio estereoscópico <sup>(3)</sup> para observar formas similares a colonias de micoplasmas, parecidas a un "huevo frito" (Tully *et al.*, 1983). Los cultivos que desarrollaron colonias con morfología de huevo frito, se purificaron mediante la técnica de clonación triple descritas por Howard *et al.*, 1994.

## **5.6 Identificación de género**

Se realizaron las pruebas de filtrabilidad, no reversión de formas L y sensibilidad a la digitonina, a partir de los aislados para determinar si los aislados pertenecían al género *Mycoplasma spp* o *Acholeplasma*.

### **5.6.1 Filtrabilidad**

Se realizó la prueba de filtrabilidad, pasando 2 ml del cultivo por una membrana estéril con poros de 0.45 µm<sup>(4)</sup>, el filtrado se sembró en medio de semisólido al 0.8% de Hayflick modificado, las bacterias filtrables fueron observadas a las 48 horas en microscopio estereoscópico, observando las colonias típicas de micoplasma (Tully, 1983).

### **5.6.2 No reversión de formas L**

La prueba fue realizada inoculando el cultivo en medio semisólido de Hayflick modificado sin la adición de penicilina; fueron sembradas en microaerobiosis a 37°C y fueron revisadas cada 24 horas, buscando observar colonias típicas de micoplasma con la finalidad de descartar las formas L de otros géneros bacterianos, cuya síntesis de pared celular es inhibida por la presencia de la penicilina en el medio de cultivo (Howard 1986, Tully 1983).

(1)Difco (2) Incubadora FISCHER SCIENTIFIC (3) Microscopio CARL ZEISS (4) Millipore

### **5.6.3 Sensibilidad a la digitonina.**

Con la finalidad de determinar la dependencia de esteroides en el medio de cultivo por parte de micoplasma que a diferencia del género *Acholeplasma*, que no requiere de él para su crecimiento, fueron saturados discos de 2 mm de diámetro con una solución de etanol y digitonina al 1.5%. Se realizaron diluciones de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-3}$  del aislado en el medio de cultivo de Hayflick, de cada dilución fueron tomados 20  $\mu$ l, depositándolo sobre la superficie del medio semisólido, deslizando el contenido en línea recta, dejándolo secar, posteriormente se colocó el disco de digitonina y la placa fue incubada a 37°C en microaerobiosis, la placa fue observada cada 24 horas. Un halo de inhibición de 3 a 5 mm de diámetro significó que correspondía al género micoplasma, caso contrario al no haber presencia del halo de inhibición pertenecía al género *Acholeplasma* (Howard 1986, Tully 1983).

### **5.7 Extracción de ADN**

Los diferentes aislamientos purificados por clonación fueron cultivados masivamente para extraer el ADN de cada uno de ellos. Para lo cual, se partió de un volumen inicial 2 ml de cultivo en medio de Hayflick modificado, aumentado el volumen gradualmente hasta obtener 100 ml. El antígeno se centrifugó a 8,000 g por 45 min. a 4°C<sup>(5)</sup>, el pellet obtenido se lavó en 3 ocasiones con una solución buffer de fosfatos (PBS), pH 7.2 estéril y fue conservado a -20°C hasta la extracción de ADN (Tully 1983). El ADN genómico fue extraído y purificado mediante el uso de 500 $\mu$ l Tiocianato de Guanidina a temperatura ambiente por 10 min, seguido de 125  $\mu$ l de acetato de amonio a 4°C por 10 minutos, 500  $\mu$ l de cloroformo- alcohol isoamilico y centrifugado a 12,000 xg por 5 minutos, recuperado de la superficie la solución acuosa a la que se le agregaron 500 ml de etanol absoluto y finalmente 1 ml de etanol al 70%. El ADN se resuspendió en 100  $\mu$ l de agua destilada inyectable y cuantificó en un espectrofotómetro<sup>(6)</sup> para verificar la cantidad de ADN necesaria para la PCR (10 a 500 ng). Para visualizar el producto de la extracción de ADN se corrieron 5  $\mu$ l en un gel de agarosa al 1% con un

buffer de carga 0.2% de azul de bromofenol y 0.2% de Xileno-Cianol y 2 µl marcador de peso molecular 1Kb plus Ladder marca invitrogen; se corrió en una solución de TAE al 1 % a 80 volts durante 40 minutos.

### **5.8 Tipificación molecular para determinar la especie del género *Mycoplasma* spp.**

Los aislados fueron identificados molecularmente mediante la PCR punto final para la identificación del género *Mycoplasma* spp., amplificando el gen *ADNr 16S* mediante los siguientes Iniciadores Fw **CTGGCTGTGTGCCTAATACATGC** y Rv **CTTCGGGCATTACCAGCTCC** (L'Abée-loun *et al.*, 2001). La amplificación del ADN se realizó mediante los siguientes tiempos: Desnaturalización inicial: 96°C por 5 min. Seguido por 30 ciclos de 94°C por 45s, 68°C por 1 min. y 72°C por 2 min. y una extensión final de 72°C por 5 min. El amplicón fue visualizado en gel de agarosa al 1% teñida con bromuro de etidio, esperando un producto de 1,370 pb, se utilizó el marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder <sup>(5)</sup>.

### **5.9 Genes empleados para la identificación molecular de *Mycoplasma mycoides* y diferentes especies de *Mycoplasmas* de importancias en unidades de producción lechera**

Fue empleada la secuencia que codifica para el gen *RNAr16S*, para identificar *Mycoplasma* sp. grupo *mycoides* (Rojas TV 2013), Para *M. bovis* se utilizaron las secuencias de los genes *OppD* y *OppF* que codifican para la oligopéptidopermeasa (Hotzel *et al.*, 1999), Finalmente para *Mycoplasma dispar* se utilizó el gen *rpoB* que codifica para la subunidad beta de la ARN polimerasa (Rojas, 2013) con la finalidad de identificar a la especie implicada en los casos de animales con afecciones respiratorias, los iniciadores empleados son listados en el cuadro 4.

(5) *Invitrogen*

Cuadro 4. Iniciadores empleados para la tipificación molecular de diferentes especies de micoplasmas en bovinos.

Especie	gen	Iniciadores 5'-3'	Producto PCR Pb
<i>M. bovis</i> AF130119	<i>oppD</i> y <i>oppF</i> 2004 pb	<b>F-CTTTTAGCTCTTTTGAACAAAT</b> <b>R-GGCTCTCATTAAAGAATGT</b>	1900
<i>M. dispar</i> DQ112172	<i>rpoB</i> 1775 pb	<b>F-GAGTTACTTCTCTTGGTCCTGGAGGTC</b> <b>R-CAATGGAATTGAATCTGATATTGCCCGC</b>	548
<i>M. mycoides</i> NC005364	<i>RNAr 16S</i> 1527 pb	<b>F-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAGG</b> <b>R-CGGGACCATTCCAAGAAGCAC</b>	970

### 5.10 Condiciones de las diferentes técnicas de reacción en cadena de la polimera (PCR) empleadas para la amplificación de las especies de micoplasmas.

Los reactivos empleados fueron utilizados a las mismas concentraciones para todas las reacciones, DNTP'S 10mM (Micromolar), buffer 10X, Cloruro de Magnesio 50mM, TAQ polimerasa fue empleada a una concentración de 500 UI (Unidades Internacionales) y los iniciadores a 20 picomolar.

Las condiciones de reacción para la amplificación de las diferentes especies de micoplasma son enlistadas en el siguiente cuadro 5.

Cuadro 5. Condiciones de amplificación para las diferentes especies de micoplasma.

Amplificación especie	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Hibridación	Extensión	Extensión final
<i>M. mycoides</i>	96°C 4 Minutos	94°C 35 Seg.	69°C 50 seg.	72°C 60 seg	72°C 5 min.
<i>M. bovis</i>	96°C 4 Minutos	94°C 30 Seg.	50°C 45 seg.	72°C 30 seg	72°C 7 min.
<i>M. dispar</i>	96°C 4 Minutos	94°C 30 Seg.	63.5°C 40 Seg.	72°C 60 seg	72°C 5 min.

Para la visualización de los productos de la PCR, Las reacciones fueron corridas durante 45 minutos a 80 Volts, en geles de agarosa al 1.5 % en 50 ml de TAE 1X, con un buffer de carga 0.2% de azul bromofenol y 0.2% de xileno-cianol y fueron visualizados con 10 mg/ml de bromuro de etidio después de electroforesis. Se utilizó un marcador de peso molecular 1kb<sup>5</sup>. Como controles positivos fueron utilizadas las cepas de *Mycoplasma* del grupo *mycoides*, la cepa Donneta PG45 para *Mycoplasma*

*bovis* y para *Mycoplasma dispar* la cepa 462/2, todas las cepas donadas por la universidad de Aarhus Dinamarca y como control negativo se utilizó agua destilada.

### 5.11 Identificación de *MmmSC* mediante análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de las regiones amplificadas empleando la enzima de restricción AluI

Con la finalidad de determinar la presencia de *MmmSC*, a los productos obtenidos de la PCR de *Mycoplasma* del grupo *mycoides*, se les realizó un ensayo mediante la enzima de restricción Alu I obtenida de *Arthrobacterluteus*. Para la diferenciación de *MmmSC* y *Mycoplasma mycoides subsp. Capri (MmmC)*, se realizó una mezcla con Buffer 10X (2 µl), Alu (1 µl), Producto ADN (10 µl), Agua estéril (7 µl). La mezcla fue incubada a 37°C por 1 h en baño de recirculación para activación de la enzima, después fue incubada a 65°C por 20 minutos. Los productos de la digestión se visualizaron en geles de agarosa al 2% en 50 ml de TAE 1X (Tris, Ácido Acético y EDTA), se utilizó el marcador de peso molecular trackit™ 50 pb, el gel fue corrido a 50 V durante 120 min, teñido con bromuro de etidio. La enzima realiza dos cortes en *MmmSC* y tres cortes en *MmmC* en las posiciones de la secuencia como se muestra en el cuadro 6, con la finalidad de observar que en el amplicón tres fragmentos en *MmmSC* y cuatros fragmentos en *MmmC*.

Cuadro 6. Tamaño de los fragmentos obtenidos con la Enzima AluI sobre el gen *ADNr 16S*

Especie	Enzima	Secuencia	Frecuencia	Tamaño de los fragmentos
<i>Mycoplasma mycoides subsp. Capri</i>	<u>AluI</u>	AGCT	43	235, 421, 605
<i>Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC</i>	AluI	AGCT	32	235, 605

### 5.12 Inmunoensayo competitivo para *MmmSC* (C-ELISA).

Los sueros colectados fueron analizados para detectar anticuerpos de *MmmSC* mediante el kit de C-ELISA, obtenido de CIRAD, Instituto Pourquier de Francia autorizada la importación al país por SAGARPA. El kit incluye placas cubiertas con el

antígeno de *MmmSC* lisado y anticuerpos monoclonales de ratón (AMR), no tienen reacción cruzada con ninguna otra especie de micoplasma, la unión de los AMR al antígeno lisado es inhibida por los sueros que fueran positivos a *MmmSC*. El punto de corte que se empleó en este estudio fue el mismo determinado por el fabricante, que corresponde al 50% de inhibición. La especificidad se definió a través de sueros colectados de animales negativos a la PBC de zonas reportadas como libres de la enfermedad; la sensibilidad fue establecida con sueros de animales infectados artificialmente, así como de sueros colectados de zonas enzoóticas. (Le Goff y Thiaucourt, 1998, OIE 2008)

#### **5.12.1 Procedimiento de la prueba de C-ELISA.**

1. Las muestras de sueros colectados de bovinos, se mezclaron con los anticuerpos monoclonales de ratón, en una placa de 96 pozos (preplaca), antes de la transferencia a la placa sensibilizada con *MmmSC*. La distribución de los controles y los sueros se puede observar en el cuadro 7.
2. Las placas con la mezcla se incubaron durante 1 hora a 37°C con agitación moderada.
3. Se realizaron dos lavados con PBS con 0.5 de tween 20.
4. Se añadió el conjugado IgG anti-ratón con peroxidasa de rábano.
5. Se incubaron durante 30 minutos a 37°C en agitación.
6. Se realizaron tres lavados con PBS con 0.5 de tween 20.
7. Se añadió el sustrato TMB (Tetrametilbenzidina). El color del sustrato cambió de verde pálido a azul y viró a amarillo después de añadir la solución de parada.
8. Se incubaron durante 30 minutos a 37°C en agitación.
9. La reacción fue parada con (0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).
10. Se realizaron las lecturas a una densidad óptica de 450 nm.
11. Se calculó el porcentaje de inhibición (PI) para cada suero mediante la siguiente fórmula:

$$PI = 100 \times [(OD_{Cm} - OD_{Test}) / (OD_{Cm} - OD_{Cc})]$$

Cuadro 7. Distribución de controles y sueros en las placas de C-ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	<b>Cc</b>	<b>Cc</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>B</b>	CP+ +	CP+ +	11									
<b>C</b>	CP+ +	CP+ +	21									
<b>D</b>	CP+ +	CP+ +	31									
<b>E</b>	CP+ +	CP+ +	41									
<b>F</b>	<b>Cm</b>	<b>Cm</b>	51									
<b>G</b>	<b>Cm</b>	<b>Cm</b>	61									
<b>H</b>	CN	CN	71									80

**Cc:** Control del conjugado (Sin suero, sin Mab = 100% de inhibición).

**Cm:** Control monoclonal (Sin suero = 0% inhibición)

CP++: Suero fuertemente positivo.

CP+: Suero fuertemente positivo.

CN: Suero fuertemente positivo.

1: Suero sospechoso # 1

2: Suero sospechoso # 2

3: ...

### 5.12.2 Criterio de validación de la prueba

La reacción se consideró válida cuando los valores de los diferentes controles se encontraban dentro de los límites establecidos para el ensayo:

- La OD (Densidad óptica) del control monoclonal (Cm) fue entre 0.5 and 2.0
- LA OD del control del conjugado (Cc) fue inferior a 0.3.
- El Porcentaje de inhibición (PI) del control negativo (CN) fue igual o inferior al 35%.
- El Porcentaje de inhibición (PI) del control débilmente positivo (CP+) fue entre el 50 y 80%.
- El Porcentaje de inhibición (PI) del control fuertemente positivo (CP++) se ubicó entre el 60 y 90%.

### 5.12.3 Interpretación de la prueba de C-ELISA

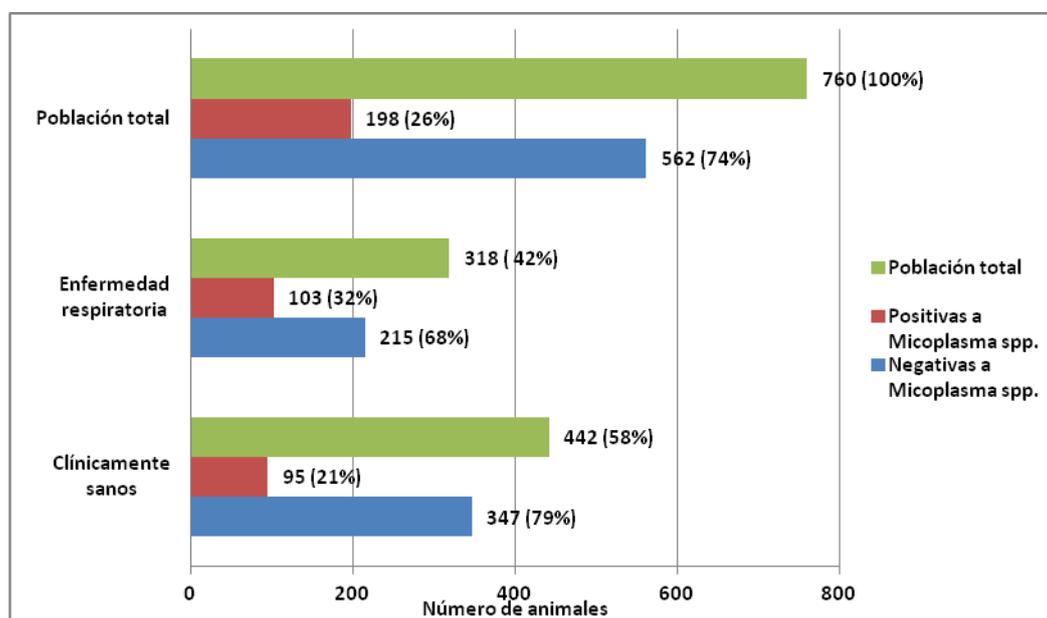
El punto de corte establecido en el Kit, establece que sueros con un porcentaje de inhibición igual o menor que 40% se consideran negativos entre el 41 y el 50% dudoso y mayor al 51% positivo.

## 6.0 Resultados

### 6.1 Aislamiento de *Mycoplasma spp.*

De los 760 hisopos nasales analizados, 318 (42%), procedían de bovinos lecheros con problemas respiratorios y 442 (58%) de clínicamente sanos. El aislamiento de *Mycoplasma spp.*, se obtuvo en 198 muestras que representaban el 26% de la población total, de las cuales 103 (32%) fueron de animales con afecciones respiratorias (Figura 1).

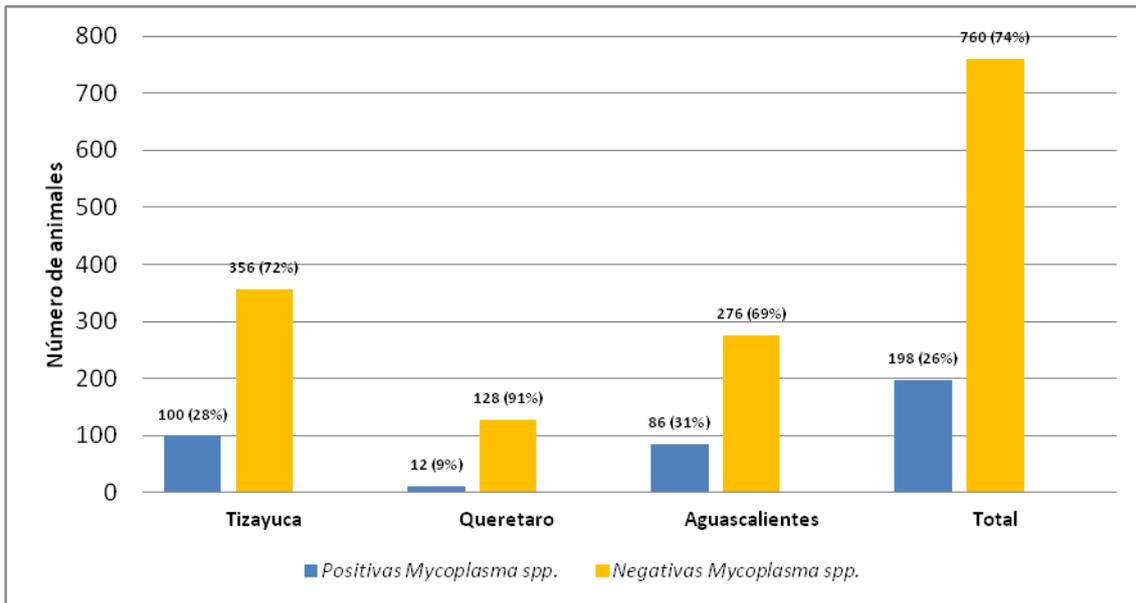
Figura 1. Porcentaje de animales positivos al aislamiento *Mycoplasma spp* respecto al estado sanitario de los animales de estudio.



### 6.2 Aislamiento de *Mycoplasma spp.* en las diferentes entidades de estudio

En el estado de Hidalgo (Cuenca lechera de Tizayuca), fueron analizadas 356 muestras colectadas en 23 establos de producción, obteniendo 100 muestras positivas a *Mycoplasma spp.*, 86 de 276 animales en 3 explotaciones lecheras en Aguascalientes y solo 12 de 128 en una unidad lechera de Querétaro fueron también positivas (Figura 2)

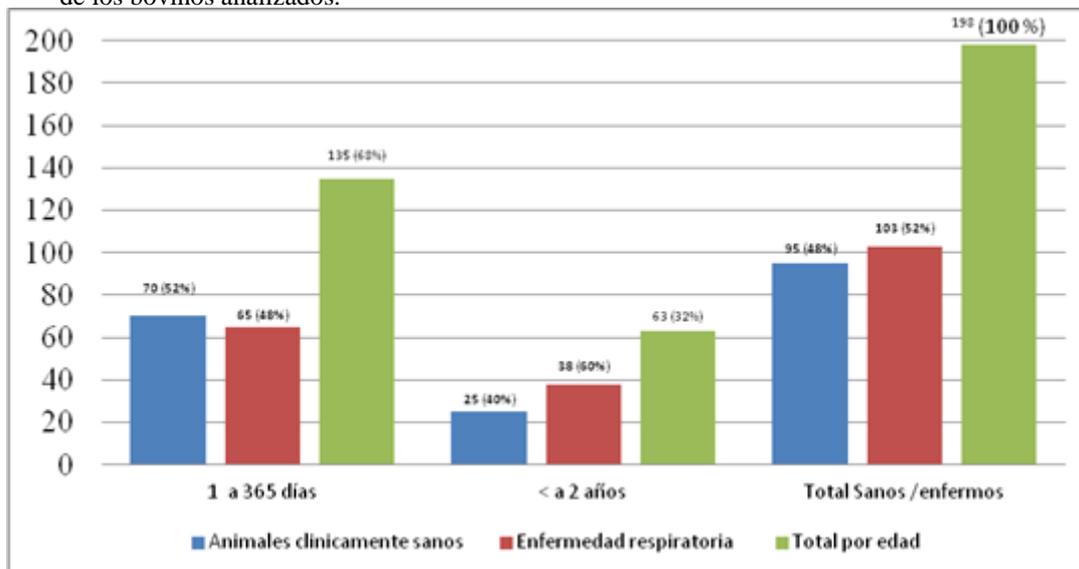
Figura 2. Porcentaje de aislamientos de *Mycoplasma spp.* En unidades de producción lechera



### 6.3 Presencia de *Mycoplasma spp.* de acuerdo a la edad y signología respiratoria

De las 198 muestras positivas a *Mycoplasma spp.* de animales con enfermedad respiratoria fue identificado el microorganismo en 65 animales (48%) de 1 a 365 días de edad y 38 (60%) en bovinos en producción mayores a 2 años (Figura 3).

Figura 3. Porcentaje de aislamientos de *Mycoplasma spp.* en relación al porcentaje de de los bovinos analizados.



## 6.4 Presencia de *Mycoplasma spp.* de acuerdo a la edad y signología respiratoria en las diferentes entidades de estudio

### 6.4.1 Estado de Hidalgo

En las unidades de estudio de la cuenca lechera de Tizayuca, de un total de 157 muestras colectadas en becerras de 1 a 365 días de edad se identificó *Mycoplasma spp.* en 59 muestras, 26 de ellas con afecciones respiratorias. En bovinos de producción mayores a 2 años fue identificado el género en 42 muestras, 28 animales con signología respiratoria (cuadro 8).

**Cuadro 8. Aislamientos de *Mycoplasma spp.*, a partir de hisopos nasales en 23 unidades de producción de Hidalgo.**

Edad	Muestras analizadas	Mycoplasma (+)	Animales clínicamente sanos	Animales con afecciones respiratorias	Mycoplasma (-)	Animales clínicamente sanos	Animales con afecciones respiratorias
1 a 365 días	157	59(38%)	33(56%)	26(44%)	98(62%)	58(59%)	40(41%)
> a 2 años	199	41(21%)	13(32%)	28(68%)	158(79%)	79(50%)	79(50%)
<b>Total</b>	<b>356</b>	<b>100(28%)</b>	<b>46(46%)</b>	<b>54(54%)</b>	<b>256(72%)</b>	<b>137(54%)</b>	<b>119(46%)</b>

### 6.4.2 Estado de Aguascalientes

En las 3 unidades de producción del estado de Aguascalientes, se identificaron 68 animales positivos a *Mycoplasma spp.* En becerras de 90 a 240 días de edad de 172 muestras, 39 de ellas presentaban problemas respiratorios. En animales adultos de 104 muestras, 18 muestras fueron positivas, 10 con afecciones respiratorias (cuadro 9).

**Cuadro 9. Aislamientos de *Mycoplasma spp.*, a partir de hisopos nasales en 3 unidades de producción de Aguascalientes.**

Edad	Muestras analizadas	Mycoplasma (+)	Animales clínicamente sanos	Animales con afecciones respiratorias	Mycoplasma (-)	Animales clínicamente sanos	Animales con afecciones respiratorias
1 a 365 días	172	68(40%)	29(43%)	39(57%)	104(60%)	58(56%)	46(44%)
> a 2 años	104	18(17%)	8(44%)	10(56%)	86(83%)	73(85%)	13(15%)
<b>Total</b>	<b>276</b>	<b>86(31%)</b>	<b>37(43%)</b>	<b>49(57%)</b>	<b>190(69%)</b>	<b>131(69%)</b>	<b>59(31%)</b>

### 6.4.3 Estado de Querétaro

En el establo de Querétaro en vaquillas de 365 días de edad se logró el aislamiento en 8 (33%) muestras de 24, en ganado adulto solo fue aislado en 4 (4%) muestras de 104, ninguna de ellas con problemas respiratorios (cuadro 10).

**Cuadro 10. Aislamientos de *Mycoplasma spp.*, a partir de hisopos nasales en una unidad de producción de Querétaro.**

Edad	Muestras analizadas	Mycoplasma (+)	Animales clínicamente sanos	Animales con afecciones respiratorias	Mycoplasma (-)	Animales clínicamente sanos	Animales con afecciones respiratorias
1 a 365 días	24	8(33%)	8 (100%)	0(0%)	16(67%)	11(69%)	5(31%)
> a 2 años	104	4(4%)	4(100%)	0(0%)	100(96%)	75(75%)	25(25%)
Total	128	12(9%)	12(100%)	0(0%)	116(91%)	86(74%)	30(26%)

### 6.5 Correlación de *Mycoplasma spp.* respecto a bovinos con enfermedad respiratoria y a su edad.

Mediante los resultados obtenidos se realizó la prueba no paramétrica de Spearman utilizando el programa IBM SPSS 20, para correlacionar la presencia de *Mycoplasma spp.* y bovinos con enfermedad respiratoria, el valor calculado fue de .001, menor al valor crítico de  $P < 0.05$  (alfa de 5%), con un intervalo de confianza del 95%. El valor calculado de Rho fue de (0.124) habiendo una correlación moderada entre la signología respiratoria y *Mycoplasma spp.* (Cuadro 11). Respecto a la edad de los animales y la prevalencia de *Mycoplasma spp.*, el valor calculado fue de 0.000 menor al valor crítico de  $P < 0.05$  (alfa de 5%), con un intervalo de confianza del 95% y un Rho de (0.248), existiendo también una correlación entre la edad de los animales y *Mycoplasma spp.* (Cuadro 12).

**Cuadro 11. Correlación de *Mycoplasma spp.* y enfermedad respiratoria de los animales de estudio.**

		MYCOPLASMA	Enfermedad respiratoria
MYCOPLASMA	Coefficiente de correlación	1.000	.124**
	Sig. (bilateral)		.001
Rho de Spearman	N	761	759
	Coefficiente de correlación	.124**	1.000
Enfermedad respiratoria	Sig. (bilateral)	.001	.
	N	760	760

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

Cuadro 12. Correlación de *Mycoplasma spp.* y edad de los animales de estudio

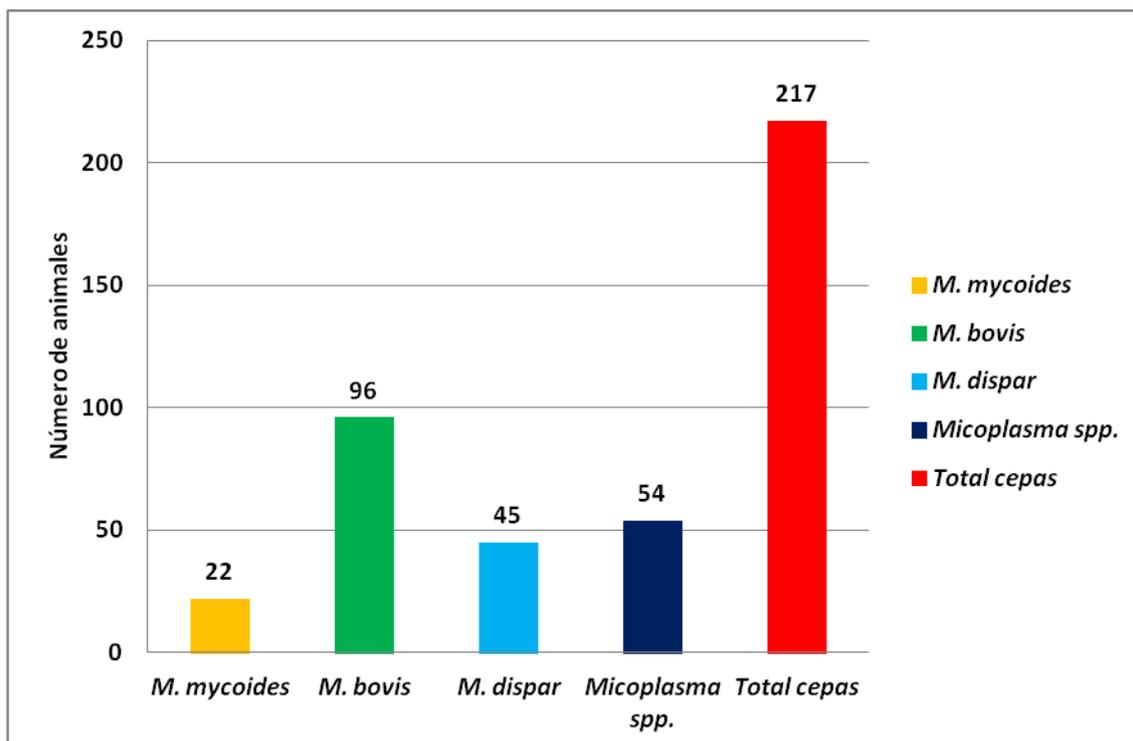
		MICOPLASMA	EDAD
MYCOPLASMA	Coefficiente de correlación	1.000	.248
	Sig. (bilateral)	.	.000
	N	760	760
EDAD	Coefficiente de correlación	.248	1.000
	Sig. (bilateral)	.000	.
	N	760	760

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

### 6.6 Tipificación molecular de diferentes especies de micoplasma.

De las 198 muestras positivas a micoplasma, se obtuvieron 217 aislamientos, identificando más de una especie en 19 muestras de hisopados nasales (10%). Las especies identificadas molecularmente con mayor frecuencia fueron *Mycoplasma bovis* en 96 (44%), seguida de *Mycoplasma dispar* en 45 (21%), *Mycoplasma mycoides* 22 (10%), y 54 (25%) solo identificadas como *Mycoplasma spp.* (Figura 4). Las figuras 1, 2 y 3, representan el producto de la PCR de las especies identificadas de micoplasmas de algunas muestras de estudio. *M. bovis* fue la especie identificada con mayor frecuencia en becerras que presentaban enfermedad respiratoria 34 (35%); sin embargo, también se pudo identificar en 36 (38%) clínicamente sanas, seguida por *M. dispar* de la misma manera en 14 (32%) becerras enfermas y 19 (42%) clínicamente sanas. El resultado global de las PCR de acuerdo a la edad y estado sanitario de los bovinos de estudio hubo una correlación entre la signología respiratoria y *Mycoplasma bovis*, donde el valor calculado fue de 0.000 menor al valor crítico de  $P < 0.05$  y un Rho de (0.136), así como una correlación entre la edad y *Mycoplasma bovis* con un Rho de (0.178) (Cuadro 13).

Figura 4. Porcentaje de especies identificadas molecularmente mediante la PCR punto final.



Cuadro 13. Frecuencia de especies de micoplasmas con respecto a la edad y estado clínico de la enfermedad de los bovinos

	Clínicamente sanos		Enfermedad respiratoria		Total positivas
	1 a 365 días	> a 2 años	1 a 365 días	> a 2 años	
<i>M. mycoides</i>	8 (36%)	2 (9%)	7 (32%)	5 (23%)	22 (10%)
<i>M. bovis</i>	36 (38%)	6 (6%)	34 (35%)	20 (21%)	96 (44%)
<i>M. dispar</i>	19 (42%)	4 (9%)	14 (31%)	8 (18%)	45 (21%)
<i>Mycoplasma spp.</i>	10 (19%)	22 (41%)	15 (28%)	7 (13%)	54 (25%)
<b>Total positivas</b>	<b>73 (34%)</b>	<b>34 (16%)</b>	<b>70 (32%)</b>	<b>40 (18%)</b>	<b>217(100%)</b>

Cuadro 14. Correlación de *Mycoplasma spp.* respecto a la enfermedad respiratoria y edad de los animales de estudio.

			Edad (Días y años)	<i>M.</i> <i>bovis</i>	Enfermedad respiratoria
Rho Spearman	Edad (Días y años)	Coefficiente de correlación	1.000	.178**	.074*
		Sig. (bilateral)	.	.000	.043
		N	761	759	759
	<i>M. bovis</i>	Coefficiente de correlación	.178**	1.000	.136**
		Sig. (bilateral)	.000	.	.000
		N	759	759	759
Enfermedad respiratoria	Coefficiente de correlación	.074*	.136**	1.000	
	Sig. (bilateral)	.043	.000	.	
	N	759	759	759	

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

\* . La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

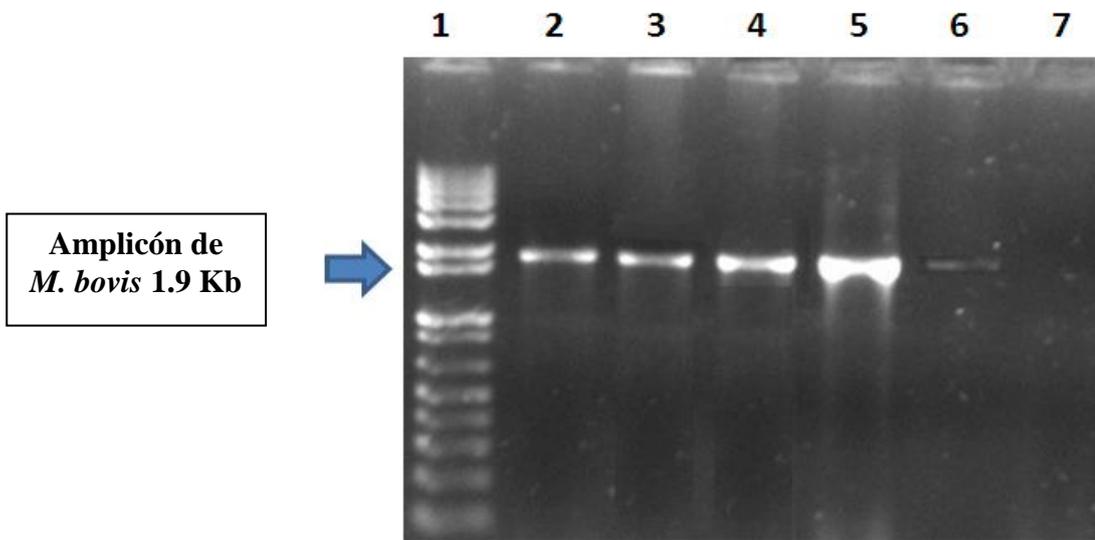


Figura 5. Productos de la PCR de *Mycoplasma bovis*. 1: marcador de peso molecular 1 kb 2: control positivo 3, 4, 5, 6: muestra positiva 7: Control negativo (Agua destilada).

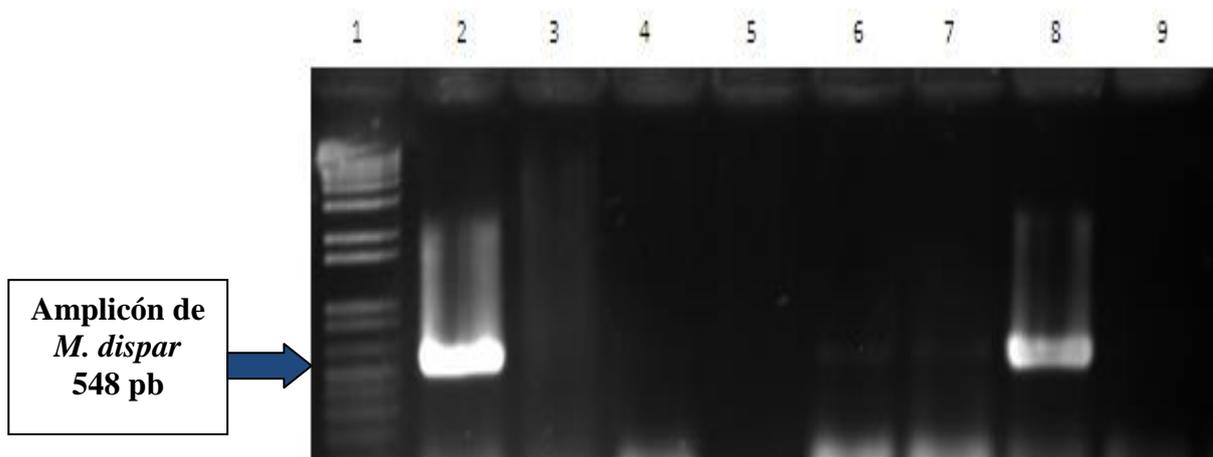


Figura 6. Productos de la PCR para *Mycoplasma dispar*. 1: marcador de peso molecular 1 kb 2: Control positivo 3, 4, 5, 6, 7: muestras negativas, 8: Muestra positiva 9: Control negativo (Agua destilada).

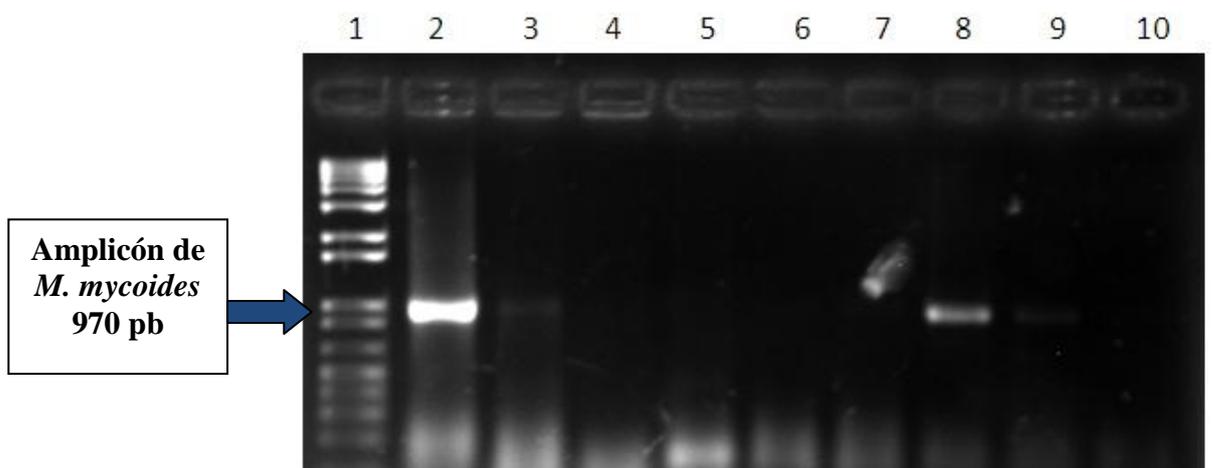
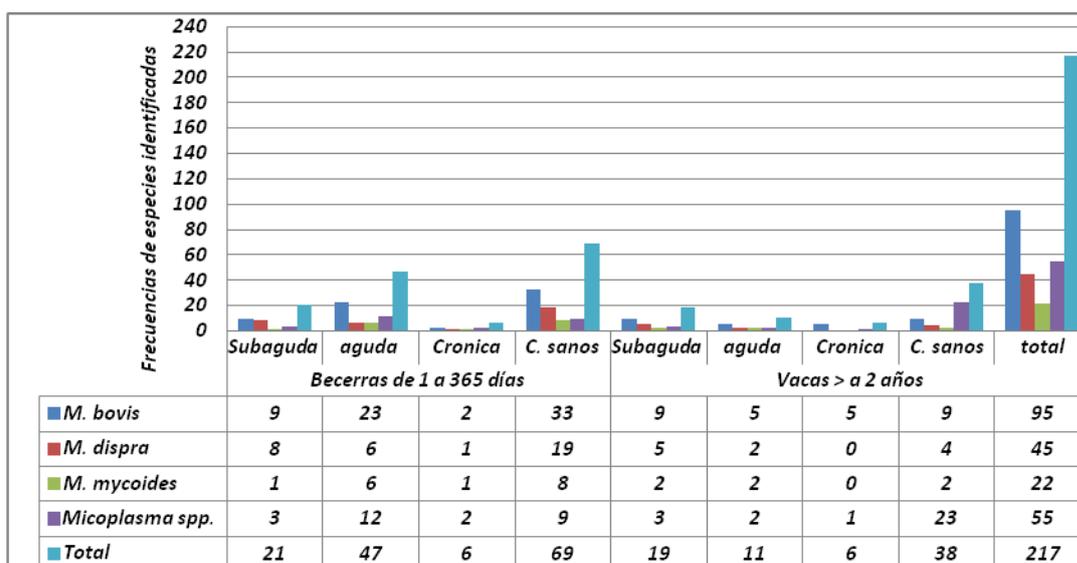


Figura 7. Productos de la PCR para *Mycoplasma mycoides* 1: marcador de peso molecular 1 kb 2: Control positivo 3: muestra positiva 4, 5, 6, 7: muestras negativas 8 y 9: Muestra positiva 10: Control negativo (Agua destilada).

### 6.7 Frecuencia de especies de *Mycoplasma* identificadas de acuerdo a la edad y grado de infección respiratoria.

Las especies de micoplasmas identificadas molecularmente en becerros en cuadros agudos fueron *Mycoplasma bovis* en 23 (24%) casos y *Mycoplasma spp.* en 12 (22%) y en los cuadros subagudos fueron identificadas *M. dispar* 8 (18%) y 6 (27%) de *M. mycoides*. En los bovinos adultos *Mycoplasma bovis* fue el más frecuente en los casos subagudos 9 (9%), seguido de *M. dispar* en 5 (11%) casos, *M. Mycoides* en 3 (5%) y 23 (24%), solo identificadas como *Mycoplasma spp.* Figura 8.

Figura 8. Frecuencia de especies de micoplasmas identificadas en relación a la edad de los animales y grado de infección respiratoria.



### 6.8 Prueba de Elisa prescrita por la OIE para detección de anticuerpos para *Mycoplasma mycoides* subsp. *Mycoides* SC

De los 760 sueros analizados para detectar anticuerpos contra *MmmSC*. mediante el kit de C-ELISA prescrito por la OIE, el porcentaje de inhibición de todas las reacciones fue igual o menor al 40% interpretado los resultados como negativos según las especificaciones del punto de corte establecido por la prueba, por lo que no se detectaron anticuerpos contra *MmmSC* en la unidades estudio. La figura 4 muestra los resultados de sueros negativos a *MmmSC* (Tonalidad Azul intenso).

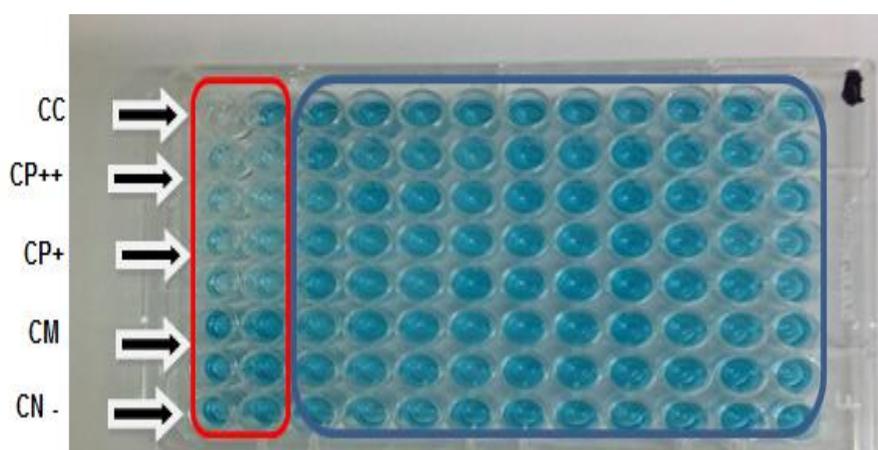


Figura 9. Placa de Elisa para *MmmSC*. Distribución de los controles (cuadro rojo) y resultado de sueros negativos a *MmmSC* (cuadro azul). **Cc**: Control del conjugado (Sin suero, sin Mab = 100% de inhibición), **Cm**: Control monoclonal (Sin suero = 0% inhibición), **CP++**: Suero fuertemente positivo, **CP+**: Suero débilmente positivo. **CN**: Suero negativos.

### 6.9 Identificación molecular de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC

Mediante la digestión del producto de la PCR con enzima de restricción Alu 1, realizada a las 22 muestras positivas a *Mycoplasma del grupo mycoides*, solo se pudieron observar en los productos obtenidos 4 (18%) muestras positivas *MmmC*, pertenecientes a una unidad de producción del estado de Aguascalientes. De 18 (82%) solo detectadas como *Mycoplasma del grupo mycoides*, por lo que molecularmente no se identificó la presencia de *MmmSC* en las unidades de producción de estudio.

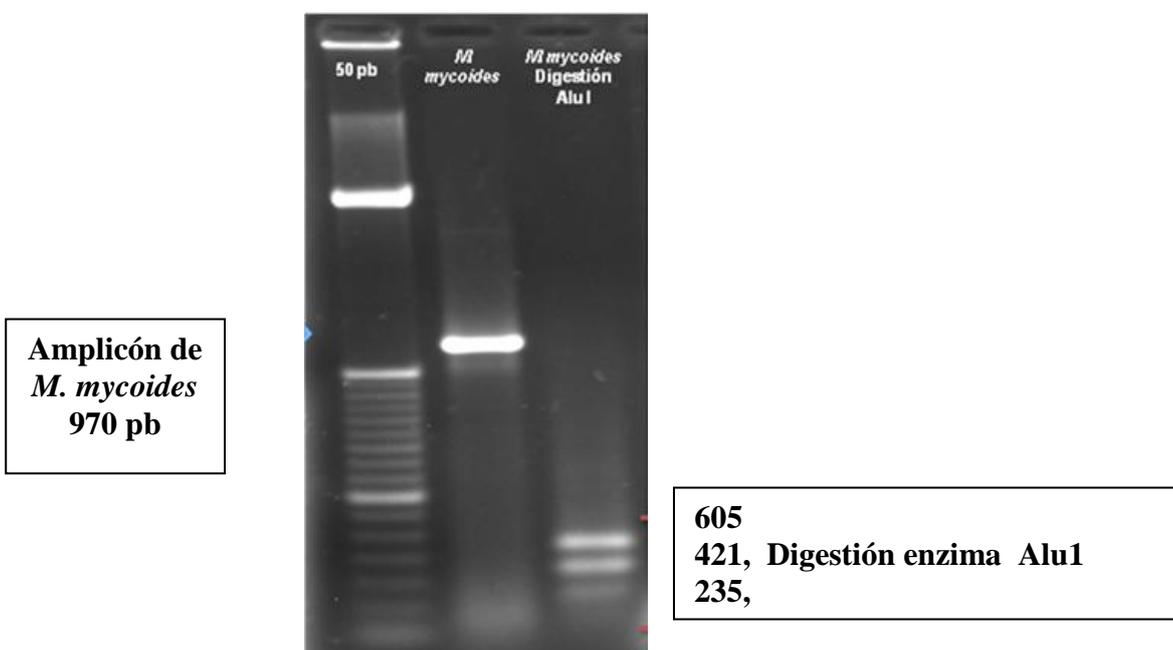


Figura 10.- Producto de la digestión de la enzima Alu1 en gel de agarosa al 2%, de la PCR obtenida del grupo mycoides, carril 1 marcador de peso molecular 50 pb, carril 2 producto de la PCR obtenido para el grupo mycoides, carril 3 producto de la digestión mediante la enzima alu1.

## 7.0 Discusión

### 7.1 Identificación de *Mycoplasma spp.*

Las enfermedades respiratorias afectan primordialmente a los bovinos alojados en producciones intensivas, y son un gran impedimento para la eficiencia en la producción, como consecuencia de la morbilidad, la mortalidad y las tasas de crecimiento pobres, dando lugar a enormes pérdidas económicas. Durante la última década, se ha hecho cada vez más claro que las infecciones por micoplasmas, son causas primarias y contribuyen a las enfermedades respiratorias bovinas en todo el mundo. Nicholas *et al.* 2008, Maunsell y Donovan 2009, Caswell *et al.* 2010.

En el presente estudio las unidades bovinas de producción láctea en bovinos con antecedentes de enfermedad respiratorias, en animales de diferentes edades, se pudo detectar la presencia de *Mycoplasmas spp.* a partir de hisopos nasales en el 26% 198/760 de animales en diferentes edades, de los cuales 318, presentaron signología respiratoria. Los datos obtenidos muestran también que el microorganismo fue hallado con mayor frecuencia en becerras de 1 a 365 días, encontrándose en 135 animales (68%), de las cuales, 65 (48%), presentaban enfermedad respiratoria. En un estudio realizado en Japón también a partir de hisopos nasales, de 301 terneros de 1 a 8 meses de edad, 155 muestras de animales que presenten signos de enfermedad respiratoria y 146 muestras de animales sanos, determinaron una prevalencia similar al de *Mycoplasma spp.* del 27.6% 81/298, mediante una PCR empleando la secuencia del gen para la ARNr 16S, Hirote *et al.*, 2003., De manera similar, Marques *et al.* 2007, reportaron una prevalencia mayor de micoplamas en 52 % en animales sanos y 100% de las muestras de los animales enfermos.

*Mycoplasma spp.* también fue identificado en el 79% de muestras obtenidas de lavados bronquioalveolares en animales que padecían signos recurrentes de enfermedad respiratoria, Thomas *et al.* 2002. Por otro lado, en una investigación posmortem, el microorganismo, fue aislado en 71.4 % 157/ 220, de pulmones de bovinos que murieron por enfermedad respiratoria Fulton *et al.* 2009. Gabinaitiene *et*

al. 2011, en Lituania, también, a partir de hisopos nasales lograron aislar a *Mycoplasma ssp.*, en el 60% de animales con enfermedad respiratoria de 110 días de edad, el 40% de 310 días y el 40% de 510 días. En un estudio más reciente a partir de pulmones e hisopos nasales en cuencas lecheras de importancia en México, se determinó una prevalencia de *Mycoplasma spp.*, en un 35% 132/374, (Rojas, 2013).

En este estudio, al realizar la PCR punto final para determinar la especie de las 217 cepas de *Mycoplasma spp.* Los resultados mostraron que *M. bovis* fue el patógeno identificado con mayor frecuencia 44% (96), seguido de *M. dispar* 21% (45), el 10%(22) pertenecientes a *Mycoplasma* del grupo *mycoides* y el 25% (54) solo identificadas como *Mycoplasma spp.* Thomas *et al.* 2002. Aislaron de terneros con enfermedad respiratoria recurrente, *M. bovis* en un 35.5%, *M. dispar* 45.5% y *M. bovirhinis* 40.9 %. Rojas TV 2013, de 141 aislados a partir de muestras de pulmón e hisopos nasales, identificó molecularmente a *Mycoplasma bovis*, 40% (56) *M. dispar*, 25 % (35) *Mycoplasma mycoides* 16 % (22) y solo *Mycoplasma spp.* 11% (16) por PCR punto final.

## **7.2 Prevalencia de *Mycoplasmas* del grupo *mycoides* y *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC***

En general el total de sueros colectados durante el estudio de animales con antecedentes de enfermedad respiratoria, no presentaron anticuerpos IgG contra *MmmSC*, por lo tanto no fueron seropositivos a PBC de acuerdo al punto de corte establecido por la prueba de ELISA competitiva prescrita por al OIE, así como no pudo ser identificado mediante al aislamiento y molecularmente al obtener las 22 (10%) muestras positivas al grupo *mycoides* del total de las cepas aisladas, al realizar la digestión enzimática con la enzima Alu1, no se visualizaron los tres fragmentos en el amplicón, por tanto no pudo ser identificada la presencia de *MmmSC* en las muestras sospechosas. Actualmente solo la enfermedad es cataloga como endémica en algunos países del continente Africano., Thiaucour *et al.* 2003, comentan que la enfermedad en

África, se ha extendido debido a cuestiones económicas, climáticas, factores políticos, limitantes en la disponibilidad de pruebas diagnósticas, lo que marca el detrimento en el control de la enfermedad. En países asiáticos, principalmente en China, han sido reportados algunos animales seropositivos, Xin *et al.*, 2007. En los países de Europa que fueron afectados por la enfermedad en los 80's y 90's el diagnóstico y control de la enfermedad son permanentes, debido a la intensa comercialización del ganado a nivel internacional. Países como Australia y Nueva Zelanda son reportados como libres desde 1967; así como, Estados Unidos y Canadá por más de 100 años. Países de Sudamérica exportadores de ganado de carne se encuentran en vigilancia general, sin embargo países vecinos a México de Centroamérica, no se encuentran en ninguna medida de vigilancia indicada. En México desde el 2008 existe una vigilancia dirigida hacia la enfermedad, sin embargo aún no ha sido reportada la presencia o ausencia de la enfermedad ante la OIE, (SAGARPA 2008, WASHID, 2013). Es de importancia mencionar que el presente estudio es el primer trabajo de investigación realizado en el país para determinar la presencia de la enfermedad, por lo que es necesario continuar con las medidas de vigilancia, debido a la demandante importación de ganado como remplazo al país.

De manera generalizada 4 muestras positivas al grupo mycoides pertenecientes a una unidad de producción del estado de Aguascalientes, se pudieron observar 4 fragmentos en los productos obtenidos por lo que fueron identificadas como *MmmC*, las 18 (82%) muestras restantes solo fueron detectadas como *Mycoplasma del grupo mycoides*. En un estudio de 60 cepas de 27 especies y subespecies del genero micoplasma se realizó análisis de restricción del producto de la PCR del gen para la RNAr 16S, mediante la enzima de restricción AluI, en la evaluación realizada para el grupo *mycoides* observaron que para *MmmC* se observaron cuatro cortes y para *MmmSC* tres fragmentos por lo que se mostró lo suficientemente estable como para ser utilizado para la identificación del microorganismo, sin embargo no se observaron diferencias en los amplicones con el resto de los miembros del grupo *mycoides* a

excepción de una banda observada en *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* después de la restricción con la enzima *HpyF10VI* (Stakenborg *et al.* 2005).

### **7.3 Prevalencia de *Mycoplasma bovis***

*M. bovis* es reconocido mundialmente como una causa importante de neumonías en todo el mundo principalmente en bovinos jóvenes, causando bronconeumonía crónica con necrosis caseosa y coagulación, que se caracterizan por infecciones persistentes que no responden bien a los antibióticos, además de causar artritis y tendosinovitis, queratoconjuntivitis y abortos, causando pérdidas financieras considerables en las unidades de producción bovina (Caswell y Archambault, 2007, Nicholas y Ayling, 2003). Los resultados obtenidos del presente estudio confirmaron la mayor prevalencia en las unidades de producción lechera de *M. bovis* principalmente en becerras que presentaron enfermedad respiratoria de grado agudo 34 (35%). También se analizó que el microorganismo se presentó en 57 (81%), animales en las etapas de destete y desarrollo en 61 a 240 días, de las cuales 30 (53%), presentaron enfermedad respiratoria, por lo que estadísticamente pudo mostrarse una correlación moderada, entre el microorganismo, la edad y enfermedad respiratoria. Un estudio, realizado en Canadá en becerros de engorda que murieron por cuadros agudos de neumonía y que a la necropsia presentaron lesiones macroscópicas en pulmones de bronconeumonía caseonecrótica, reportaron una prevalencia similar a la del estudio 36% 36/99, Gagea *et al.* 2006. En estudios epidemiológicos realizados en Francia del 2003 al 2008, donde participaron 23 laboratorios de referencia, reportaron que la especie de micoplasma mayormente aislada fue *M. bovis* en un 55% de 1142 muestras colectadas (Chazel *et al.* 2010). Así mismo en el Reino Unido en los años 1995-2005, determinaron una prevalencia del 42,4 % (Lawes *et al.* 2008. Rojas, 2013), de 141 aislados a partir de muestras de pulmón e hisopos nasales, identificó molecularmente a *Mycoplasma bovis*, en un 40%. Sin embargo en Bosnia y Herzegovina, de 221 hisopos nasales de animales clínicamente sanos y 107 con signos clínicos de infección respiratoria y 59 muestras de pulmón de animales que

presentaban neumonía, solo lograron la identificación de *Mycoplasma spp.* en 27 (6.9%) muestras y solo 8 hisopos nasales y 2 muestras de pulmones, fueron positivos a *M. bovis*, (Maksimović *et al.* 2012).

En otro estudio mediante aislamiento de 70 pulmones de bovinos jóvenes y 70 bovinos adultos, *M. bovis*, solo fue aislado en el 25% (16/64) de los pulmones de bovinos jóvenes que presentaron lesiones neumónicas, sin embargo este no pudo ser aislado en ningún caso de los pulmones de bovinos adultos., al realizar una Elisa indirecta de sueros colectados antes de su sacrificio todos los animales jóvenes resultaron ser seropositivos 100% (70/70) a *M. bovis* y el 76% (53/70) de los adultos. Gabinaitiene *et al.* 2011. Mediante un estudio serológico, detectaron anticuerpos contra *M. bovis* en un 75% de los sueros en grupos de bovinos con enfermedad respiratoria de 110 días de edad, 50% de 310 días y 55% de 510 días. Estudios *post mortem* de ganado en corrales de engorda en México localizados en General Escobedo Nuevo León; Morelia, Michoacán, Mexicali, Baja California, Culiacán y Sinaloa (Romero *et al.*, 2010). De ocho pulmones de casos crónicos de bronconeumonía supurativa con focos de necrosis caseosa, mediante las pruebas de inmunohistoquímica resultaron positivas, y confirmaron la presencia de *M. bovis* en todos los casos.

#### **7.4 Prevalencia de *Mycoplasma dispar***

*M. dispar* se identificó en 45 (21%) muestras de becerras, 14 (32%) con enfermedad respiratoria y 19 (42%) clínicamente sanas. Se pudo analizar que 10 (22%) muestras estuvieron asociadas con *M. bovis*. En el año 1997 hasta el 2000, fueron examinadas un total de 150 becerras sanas y 238 animales con enfermedad respiratoria, para seis especies de micoplasma, dentro de ellas *M. dispar*, que fue aislado de 45,5 % de los terneros que padecían enfermedades respiratoria recurrente, asociada en el mayor número de los casos con *M. bovis* (Thomas *et al.* 2002). En un estudio similar a partir de hisopos nasales recogidos de 301 terneros, donde 155 muestras pertenecían a animales con enfermedad respiratoria y 146 muestras de clínicamente sanos. *M.*

*dispar* fue detectada en 6 % de los animales sanos y en 35 % de los animales enfermos, Marques *et al.* 2007. En un estudio mediante bacteriología y una PCR a partir de lavados endotraqueales de 56 becerras sin enfermedad respiratoria y 34 con neumonía, realizado en 6 unidades bovinas de producción lechera, mediante el cultivo bacteriano no pudo ser identificada *M. dispar*, y solo al realizar una PCR pudo ser identificado en 21 animales clínicamente sanos y 79 con neumonía (Angen *et al.* 2008).

## 8.0 Conclusiones

- se aisló *Mycoplasma spp.* en las unidades bovinas de producción láctea con antecedentes de enfermedad respiratoria y en animales de diferente edad, en un 26% (198/760) del total de muestras de exudados nasales, analizadas; de los cuales 318 provenían de animales con signología de enfermedad respiratoria.
- De los 760 sueros analizados para detectar anticuerpos contra *MmmSC*. mediante el kit de C-ELISA prescrito por la OIE, el porcentaje de inhibición de todas las reacciones fue igual o menor al 40% interpretado los resultados como negativos según las especificaciones del punto de corte establecido por la prueba, por lo que no se detectaron anticuerpos contra *MmmSC* en la unidades estudio.
- De 22 muestras positivas identificadas por PCR como *Mycoplasma del grupo mycoides.*, se determinó mediante digestión de los amplicones con la enzima de restricción AluI, que solo cuatro de los productos (18%) correspondían a *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (*MmmC*), pertenecientes a una unidad de producción del estado de Aguascalientes. Sin embargo para poder identificar la especie y subespecie de las 18 muestras restantes que fueron identificadas como *Mycoplasma del grupo mycoides*, implicados en los procesos respiratorios de bovinos lecheros, deben de ser empleadas otras técnicas para su identificación.

- Los resultados obtenidos molecularmente confirmaron la mayor prevalencia en las unidades de producción lechera de *M. bovis*, principalmente en becerras que presentaron enfermedad respiratoria de grado agudo 34 (35%). También se analizó que el microorganismo se presentó en 57 (81%), de animales positivos en las etapas de destete y desarrollo (61 a 240 días), de las cuales 30 (53%), presentaron enfermedad respiratoria
- Se realizó la prueba no paramétrica de Spearman, para correlacionar la presencia de *Mycoplasma spp.* y bovinos con enfermedad respiratoria, el valor calculado fue de .001, menor al valor crítico de  $P < 0.05$  (alfa de 5%), con un intervalo de confianza del 95%. El valor calculado de Rho fue de (0.124) habiendo una correlación moderada entre la signología respiratoria y *Mycoplasma spp.* Respecto a la edad de los animales y la prevalencia de *Mycoplasma spp.*, el valor calculado fue de 0.000 menor al valor crítico de  $P < 0.05$  (alfa de 5%), con un intervalo de confianza del 95% y un Rho de (0.248), existiendo también una correlación entre la edad de los animales y *Mycoplasma spp.*
- De las especies de micoplasmas identificadas, solo se pudo observar una correlación entre la signología respiratoria y *Mycoplasma bovis*, donde el valor calculado fue de 0.000 menor al valor crítico de  $P < 0.05$  y un Rho de (0.136), así como una correlación entre la edad y *Mycoplasma bovis* con un Rho de (0.178).

## 9.0 Literatura citada

1. Amanfu W., Sediadie S., Masupu K.V., Benkirane A., Geiger R. & Thiaucourt F. Field validation of a competitive ELISA for the detection of contagious bovine pleuropneumonia in Botswana. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 1998; 51: 189–193.
2. Andrews A. H., Blowey R. W., Boyd H., Eddy R. G. *Bovine Medicine: Diseases and Husbandry of Cattle.* Blackwell Scientific Publications, Oxford. 2004: 239-248 and 286-293.
3. Ayling RD, Bashiruddin SE, Nicholas RA. Mycoplasma species and related organisms isolated from ruminants in Britain between 1990 and 2000. *Vet Rec.* 2004; 155:413-416.
4. Angen O., John T., Larsen L. E., Larsen, J., Kokotovic<sup>1</sup> B., Peter H., Jörg M.H., Enemark M.D. Respiratory disease in calves: Microbiological investigations on trans-tracheally aspirated bronchoalveolar fluid and acute phase protein response. *Vet. Microbiol.* 2008; 10:1016.
5. Belloy L, Vilei EM, Giacometti M, Frey J. Characterization of LppS, an adhesin of *Mycoplasma conjunctivae*. *Microbiol.* 2003-193.
6. Brandão E. Isolation and identification of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* SC strains in sheep and goats. *Vet Rec.* 1995; 136:98-99.
7. Bové JM. The one-hundredth anniversary of the first culture of a mollicute, the contagious bovine peripneumonia microbe, by Nocard and Roux, with the

- collaboration of Borrel, Salimbeni, and Dujardin-Baumetz. *Res Microbiol.* 1999; 150:239-245.
8. Bischof DF, Janis C, Vilei EM, Bertoni G, Frey J. Cytotoxicity of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type to bovine epithelial cells. *Infect Immun.* 2008; 76:263-269.
  9. Caswell J. F., Bateman K. G., Cai Y. & Castillo-Alcala F. *Mycoplasma bovis* in respiratory disease of feedlot cattle. *Vet Clin N Am-Small* 2010; 26:365–379.
  10. Caswell L. and Archambault M. *Mycoplasma bovis* pneumonia in cattle *Animal Health. Res. Rev.* 2007; 8:161–186.
  11. Chazel M., Tardy F., Le Grand D., Calavas D. and Poumarat F. Mycoplasmoses of ruminants in France: recent data from the national surveillance network *BMC Vet. Res.* 2010; 6:32
  12. Dedieu L, Balcer-Rodrigues V, Yaya A, Hamadou B, Cisse O, Diallo M, Niang M. Gamma interferon-producing CD4 T-cells correlate with resistance to *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC infection in cattle. *Vet ImmunolImmunopathol.* 2005; 107:217-233.
  13. Done, S., Palmer, N.M.A. and Nicholas, R.A.J. An emerging disease in Europe: Contagious bovine pleuropneumonia. *Cattle Pract.* 1995; 3:13–20.
  14. Fisher J. The origins, spread and disappearance of contagious bovine pleuropneumonia in New Zealand. *Aust Vet J.* 2006; 84:439-44.

15. Food and Agriculture Organization of the United Nations Proceedings of the 3rd Meeting of the FAO-OIE-OAU/IBAR-IAEA Consultative Group on CBPP. Rome, Italy. 2004. Toward sustainable CBPP control programmes for Africa.
16. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Contagious bovine pleuropneumonia. EMPRESS Transboundary Animal Diseases Bulletin 2003; 24:2–7.
17. Gagea M.I., Bateman K.G., van Dreumel T., McEwen T.J., Carman S., Archambault M., Shanahan R.A, Caswell J. L. Diseases and pathogens associated with mortality in Ontario beef feedlots. J Vet Diagn Invest, 2006; 18:18–28.
18. Gibbs A. Practical approach to the control of pneumonia in housed calves. *In practice*. 2001; 32-39.
19. Gonçalves, R., Ferreira-Dias, G., Belo, A., Correia, J., Ferreira, M.L. and Goulão J.V. Pathological and immunological characteristics of ewes experimentally infected with *Mycoplasma mycoides* subsp. *Mycoides* SC isolated from cattle and sheep. Small Ruminant Res 2002; 46: 51–62.
20. Hayflick L. Tissue cultures and mycoplasmas. Tex Rep Biol Med. 1965; 23: Suppl 1:285.
21. Hamsten C, Westberg J, Bölske G, Ayling R, Uhlén M, Persson A. Expression and immunogenicity of six putative variable surface proteins in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. Microbiol. 2008; 154:539-549.

22. Hirose K., H. Kobayashi, N. Ito<sup>2</sup>, Y. Kawasaki, M. Zako, K. Kotani, H. Ogawa and Sato H., Isolation of Mycoplasmas from nasal swabs of calves affected with respiratory diseases and antimicrobial susceptibility of their isolates. J. Vet. Med. 2003; 50: 347–351
23. Howard WW, Rosenbusch FR, Lauerman HL, Micoplasmosis in animals: Mycoplasmosis committee of american association of veterinary laboratory diagnosis; 1994. EEUU. Iowa State University Press.
24. Hotzel H, Heller M, sachse K. Enhancement of *Mycoplasma bovis* detection in milk samples by antigen capture prior to PCR. Mol and Cell Probes 1999; 13:175-176.
25. Huebschle OJ, Ayling RD, Godinho K, Lukhele O, Tjipura-Zaire G, Rowan TG, Nicholas RA. Danofloxacin (Advocin) reduces the spread of contagious bovine pleuropneumonia to healthy in-contact cattle. Res Vet. Sci. 2006; 81:304-309.
26. Jungi TW, Krampe M, Sileghem M, Griot C, Nicolet J. Differential and strain-specific triggering of bovine alveolar macrophage effector functions by mycoplasmas. Microb. Pathog. 1996; 21:487-498.
27. Kim S. Wise, Michael J. Calcutt, Mark F. Foecking, RamanaMadupu, Robert T. De Boy, Kerstin Röske, Miranda L. Hvinden, Tara R. Martin, A. Scott Durkin, John I. Glass, Barbara A. Methé. Complete Genome Sequences of *Mycoplasma leachii* Strain PG50<sup>T</sup> and the Pathogenic *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony Biotype Strain Gladysdale. 2012; 194: 4448–4449.

28. Le Goff C, Thiaucourt F. A competitive ELISA for the specific diagnosis of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). *Vet Microbiol.* 1998; 28:179-91.
29. Maksimović Z., Rifatbegović M. Mycoplasmas isolated from the respiratory tract of cattle in bosnia and Herzegovina. 2012; 28: 79-83.
30. March JB, Brodlie M. Comparison of the virulence of European and African isolates of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* small colony type. *Vet Rec.* 2000; 147:20-21.
31. Marques LM, Buzinhani M, Yamaguti M, Oliveira R C, Ferreira J B. Mettifogo E, Timenetsky J. Use of a polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma dispar* in the nasal mucus of calves. *J Vet Diag Invest* 2007 19:103–106.
32. Marobela-Raborokwge, C., Nicholas, R.A.J., Ayling, R.D. and Bashiruddin, J.B. Comparison of CFT, immunoblotting, indirect and competitive ELISA for detecting antibodies to *Mycoplasma mycoides* SC in naturally infected cattle in the 1995 CBPP outbreaks in Botswana. *Onderstepoort J Vet.* 2003; 70, 21–22.
33. Maunsell F. P. & Donovan G. A. *Mycoplasma bovis* in young calves. *Vet Clin N Am-Food A* 2009; 25:139–177.
34. McAuliffe L, Ellis RJ, Lawes JR, Ayling RD, Nicholas RA. 16S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis; a single generic test for detecting and differentiating *Mycoplasmas* species. *J Med Microbiol.* 2005; 54:731-739.

35. McAuliffe L, Ellis RJ, Miles K, Ayling RD, Nicholas RA. Biofilm formation by mycoplasma species and its role in environmental persistence and survival. *Microbiol.* 2006; 152: 913-922.
36. Miles RJ. Catabolism in mollicutes. *J Gen Microbiol.* 1992; 13:1773-1783.
37. Miltiadou DR, Mather A, Vilei EM, Du Plessis DH. Identification of genes coding for B cell antigens of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony (MmmSC) by using phage display. *BMC Microbiol.* 2009; 9:215.
38. Minion FC. Molecular pathogenesis of mycoplasma animal respiratory pathogens. *Front Biosci.* 2002; 7: 1410-1422.
39. Monnerat MP, Thiaucourt F, Nicolet J, Frey J. Comparative analysis of the lppA locus in *capricolum* subsp. *capricolum* and *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*. *Vet Microbiol.* 1999; 69:157-172.
40. Nicholas, R.A.J., Bashiruddin, J.B., Ayling, R.D. and Miles, R.J. Contagious bovine pleuropneumonia: a review of recent development. *Vet. Bulletin* 2000; 70, 827–838.
41. Nicholas R., Baker S., Ayling R., Stipkovits L. *Mycoplasma* infections in growing cattle. *Cattle prac.* 2000; 8:115-118.
42. Nicholas R., Ayling R. D. & McAuliffe L Bovine respiratory disease. In *Mycoplasma Diseases of Ruminants.* CABI. 2008; 133–154
43. Nicholas R, Ayling R, McAuliffe L. Contagious bovine pleuropneumonia a reminder. *Vet Rec.* 2009; 756-757.

44. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees). Contagious bovine pleuropneumonia, Biological Standards Commission. OIE 2008; Chapter 2.4.9. 716–719.
45. Persson A, Jacobsson K, Frykberg L, Johansson KE, Poumarat F. Variable surface protein Vmm of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type. *J Bacteriol.* 2002; 18: 3712-3722.
46. Pilo P, Martig S, Frey J, Vilei EM. Antigenic and genetic characterisation of lipoprotein lppC from *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Vet Res.* 2003;34:761-775.
47. Provost A. Perreau P. Breard A. Le Goff C. Martel J.L. Cottew G.S. Contagious bovine pleuropneumonia. *Rev Sci Tech.* 1987; 6:625–679.
48. Radaelli E., Luini M., Loria G.R., Nicholas R.A.J., Scanziani E. Bacteriological, serological, pathological and immunohistochemical studies of *Mycoplasma bovis* respiratory infection in veal calves and adult cattle at slaughter. *Res. Vet. Sci.* 2008; 85: 282–290.
49. Razin, S. and Freundt, E.A. The mycoplasmas. In: Krieg, N.R. and Holt, J.G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland 1984; 740–770.
50. Razin, S. The genera *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Acholeplasma*, *Anaeroplasma*, and *Asteroplasma*. In: Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.H. (eds) *The Prokaryotes*, Vol. 2, 2nd edn. Springer-Verlag, New York 1991; 1937–1959.
51. Razin S. Molecular biology and genetics of mycoplasmas (Mollicutes). *Microbiol Rev.* 1985; 49:419-455.

52. Regalla J, Caporale V, Giovannini A, Santini F, Martel JL, Gonçalves AP. Manifestation and epidemiology of contagious bovine pleuropneumonia in Europe. *Rev Sci Tech.* 1996; 15:1309-1329.
53. Rodwell A.W., Barile M.F., Razin S. and Mitchell, A. Nutrition, growth and reproduction. In: *The Mycoplasmas*, Vol. 1. Academic Press, New York 1979 103–113.
54. Rottem S AND Yogev D. Mycoplasma interaction with host eukaryotic cells. In: *Bacterial Invasion into Eukaryotic Cells*. Subcellular Biochemistry, edited by Oelschlaeger TA and Hacker J. New York: Plenum, 2000; 33:199–228.
55. Rottem S. Interaction of mycoplasmas with host cells. *Physiol Rev.* 2003; 83:417-32.
56. 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 Tavera, Laura Jaramillo Meza, 2013.
57. Sachse K, Helbig JH, Lysnyansky I, Grajetzki C, Müller W, Jacobs E, Yogev D. Epitope mapping of immunogenic and adhesive structures in repetitive domains of *Mycoplasma bovis* variable surface lipoproteins. *Infect Immun.* 2000; 68:680-687.
58. Santini F.G., Visaggio M., Farinelli G., Di Francesco G., Guarducci M., D'Angelo A.R., Scacchia M. & Di Giannatale E. Pulmonary sequestrum from *Mycoplasma*

- mycoides* var. *mycoides* SC in a domestic buffalo; isolation, anatomo-histopathology and immuno-histochemistry. *Vet. Ital.* 1992; 4: 4–10.
59. Scacchia M, Tjipura-Zaire G, Lelli R, and Sacchini F, Pini A. Contagious bovine pleuropneumonia: humoral and pathological events in cattle infected by endotracheal intubation or by exposure to infected animals. *Vet Ital.* 2011; 47:407-413.
60. Schubert E., Sachse k., Jores J. and Martin H. Serological testing of cattle experimentally infected with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony using four different tests reveals a variety of seroconversion patterns. *Vet Rec* 2011; 7:72.
61. Stakenborg T., Viccaj., Butaye P., Maes D., Baere T., Verhelst R., Peeters J., Kruijff A., Haesebrouck F. and Vanechoutte M. Evaluation of amplified rDNA restriction analysis (ARDRA) for the identification of *Mycoplasma* species. *BMC Infect. Dis.* 2005, 5:46
62. Ter Laak EA. Contagious bovine pleuropneumonia. A review. *Vet Q.* 1992; 14:104-110.
63. Thiaucourt F, Dedieu L, Maillard JC, Bonnet P, Lesnoff M, Laval G, and Provost A: Contagious bovine pleuropneumonia vaccines, historic highlights, present situation and hopes. In *Vaccines for OIE List A and Emerging Animal Diseases*. Volume 114. Edited by: Brown F, Roth J. Basel: Dev Biol; 2003:147-160.
64. Thomas A, Ball H, Dizier I, Trolin A, Bell C, Mainil J, Linden A. Isolation of mycoplasma species from the lower respiratory tract of healthy cattle and cattle with respiratory disease in Belgium. *Vet Rec.* 2002; 151:472-476.

65. Tully, J.G y Razin S. Cloning and filtration techniques for *Mycoplasmas*. In Methods in Mycoplasmaology. Estados Unidos Academic Press 1983; 173-177.
66. Vilei EM, Abdo EM, Nicolet J, Botelho A, Gonçalves R, Frey J. Genomic and antigenic differences between the European and African/Australian clusters of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. Microbiol. 2000; 146: 477-486.
67. Westberg J, Persson A, Holmberg A, Goesmann A, Lundeberg J, Johansson KE, Pettersson B, Uhlén M. The genome sequence of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC type strain PG1T, the causative agent of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). Genome Res. 2004; 14:221-227.
68. Xin, J.-Q., Gao, Y.-I., Li, Y., Wang, Y.-F. And Qian, A. D. Development of an indirect ELISA for seromonitoring CBPP using recombinant lipoprotein LppQ of *Mycoplasma mycoides* subsp. *Mycoides* SC as antigen. Agr. Sci in China. 2007; 6: 100–107.