



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

**MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS – MENCIÓN PROTECCIÓN DE
LOS ALIMENTOS**

**“IDENTIFICACION MOLECULAR DE ESPECIES DE
MYCOPLASMA DE ORIGEN BOVINO AISLADOS DE LA
CUENCA LECHERA CENTRAL ARGENTINA”**

AUTOR: Lic. Veronica Elizabeth Neder

Tesis para optar el grado de
MAGISTER SCIENTIAE EN CIENCIAS VETERINARIAS

Esperanza, 2017



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

**MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS – MENCIÓN PROTECCIÓN DE
LOS ALIMENTOS**

**“IDENTIFICACION MOLECULAR DE ESPECIES DE *MYCOPLASMA* DE
ORIGEN BOVINO AISLADOS DE LA CUENCA LECHERA CENTRAL
ARGENTINA”**

AUTOR: Lic. Veronica Elizabeth Neder

DIRECTOR: Dr. Luis Fernando Calvino

MIEMBROS DEL JURADO:

Dra. Liliana Odierno.

Dra. Celina Baravalle.Mgter

Vet. Carina Boggero

Un poco de ciencia aleja de Dios,
pero mucha ciencia
devuelve a El.

Louis Pasteur, microbiólogo y
químico francés (1822-1895).

A mi hijo, Federico, mi creación única.....

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Luis Calvinho, quien me permitió y estimulo durante todos estos años el poder realizarme como profesional, dándome siempre libertad para la toma de decisiones, respetando y confiando en mi e ir así creciendo día a día como persona y como profesional.

A mis compañeros de trabajo que desde hace casi 2 décadas compartimos el cordial ámbito laboral de Sanidad Animal. Especialmente al Mgt. Med. Vet. Carlos Vitulich por su compañía y consejos.

A mis compañeros del reciente grupo creado de Bioinformática (CONICET-INTA) por todo lo aportado y quienes han colaborado con el diseño, realización e interpretación de los primers.

Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria por otorgarme la beca para la realización de mi posgrado.

A mi familia, por acompañarme incondicionalmente durante estos años y en la vida.

ABREVIATURAS

ADN: Ac. desoxirribonucleico.

AFLPs: Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de amplificación.

ARN: Ac. ribonucleico.

ARNr: Ac. ribonucleico ribosomal.

ARNt: Ac. ribonucleico de transferencia.

ATCC: Colección de cultivo tipo americano.

G+C: Guanina + citosina.

Kb: Kilobases.

MDA: Megadalton

pb: Pares de bases.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PPLO: Organismos similares al de la pleuroneumonía.

RAPDSs: Amplificación aleatoria de ADN polimórfico.

T_m: Temperatura de melting.

VPS: Lipoproteínas variable de superficie.

INDICE

Abreviaturas.....	vi
Resumen.....	ix
Summary.....	xi
I. Introducción.....	12
I.1. Agente Etiológico.....	13
I.2. Clasificación taxonómica.....	14
I.3. Cultivo y características fisiológicas.....	16
I.4. Características e identificación.....	17
I.5. Biología molecular y filogenia de la clase <i>Mollicutes</i>	19
I.6. Diagnóstico de enfermedades causadas por <i>Mycoplasma</i>	22
I.7. Mastitis por <i>Mycoplasma</i>	23
I.8. Objetivos.....	26
I.9. Hipótesis.....	26
II. Revisión bibliográfica.....	28
III. Materiales y métodos.....	34
III.1. Muestras.....	35
III.2. Cepas <i>Mycoplasma</i>	35
III.2.2. Condiciones de cultivo.....	35
III.2.3. Conservación de cepas de <i>Mycoplasma</i>	36
III.2.4. Extracción de ADN genómico.....	36
III.2.5. Purificación de ADN para secuenciar.....	37
III.2.6. Secuenciación de los fragmentos amplificados.....	39
III.2.7. Análisis de las secuencias y diseño de primers.....	39
III.2.8. Soluciones utilizadas en los estudios moleculares.....	39
III.3. Procedimientos para la amplificación del ADN de las cepas.....	40
III.3.1. Método de la PCR-Simple para la detección de la clase <i>Mollicutes</i>	40
III.3.1.1. Primers.....	40

III.3.1.2. Programa de amplificación.....	40
III.3.1.3. Mezcla de reacción.....	41
III.3.1.4. Análisis de los productos de amplificación.....	41
III.3.2. Método de la PCR-simple para la identificación de <i>M. bovis</i>	42
III.3.2.1. Primers.....	42
III.3.2.2. Programa de amplificación.....	43
III. 3.2.3. Mezcla de reacción.....	44
III.3.2.4. Análisis de los productos de amplificación.....	44
III.3.3. Método de Multiplex-PCR para la identificación de <i>M. bovis</i> y <i>M. canadense</i>	44
III.3.3.1. Primers.....	45
III.3.3.2. Programa de amplificación.....	45
III.3.3.3. Mezcla de reacción.....	46
III.3.3.4. Análisis de los productos de amplificación.....	46
III.3.4. Método de Multiplex-PCR para la identificación de <i>M. californicum</i> y <i>M. leachii</i>	47
III.3.4.1. Primers.....	47
III.3.4.2. Programa de amplificación.....	47
III. 3.4.3. Mezcla de reacción.....	48
III.3.4.4. Análisis de los productos de amplificación.....	48
IV Resultados.....	49
IV.1. Aislamiento e identificación preliminar.....	50
IV.2. Identificación molecular mediante PCR genérica.....	52
IV.3. Identificación molecular de <i>M. bovis</i> por amplificación sec. conservada.....	52
IV.4. Identificación molecular de aislamientos diferentes a <i>M. bovis</i>	53
V. Discusión.....	57
VI. Conclusiones.....	63
VII. Referencias bibliográficas.....	65
VII. Anexo/Apéndice.....	80

RESUMEN

Los *Mycoplasma* pertenecen a la clase *Mollicutes* y son los microorganismos procariotas autoreplicables más pequeños que existen en la naturaleza. Estos organismos carecen de pared celular y tienen una limitada capacidad biosintética, lo cual hace necesario una estricta dependencia del huésped para su nutrición y refugio. Los *Mycoplasma* son habitantes de las superficies mucosas respiratoria, urogenital, conjuntival, el tracto gatrointestinal y glándula mamaria, pudiendo causar enfermedad respiratoria, otitis, mastitis, artritis, enfermedad reproductiva, meningitis y conjuntivitis en bovinos. Existen más de once especies de *Mycoplasma* que se han aislado de bovinos, entre ellas, *M. bovis* se considera la más prevalente en los EE.UU. y en algunos países de Europa. Por lo tanto, la mayoría de la información actual proviene de reportes de casos y trabajos de investigación realizados sobre esta especie.

El objetivo general de este trabajo fue determinar las especies de *Mycoplasma* que producen infecciones en el ganado bovino en Argentina y desarrollar un método de identificación de las especies prevalentes. Para ello, se realizó una búsqueda del agente infeccioso en muestras de leche de tanque, leche de vaca individual y órganos de terneros. Posteriormente se llevó a cabo la puesta a punto de dos técnicas de MULTIPLEX-PCR para la identificación de *M. bovis*, *M. californicum*, *M. canadense* y *M. leacchi*. Es la primera vez que se reportan el aislamiento de *M. leacchi* en Argentina. Este desarrollo facilitara la identificación de las especies de *Mycoplasma* más frecuentemente aisladas de infecciones en ganado lechero.

SUMMARY

Mycoplasma belong to the class Mollicutes and are the smallest self-replicating prokaryotic microorganisms that exist in nature. These organisms lack the cell wall and have a limited biosynthetic capacity, which determines a strict dependence on the host for their nutrition and shelter. *Mycoplasma* are inhabitants of the respiratory, urogenital, conjunctival mucosal surfaces, gastrointestinal tract and mammary gland; being able to cause respiratory disease, otitis, mastitis, arthritis, reproductive disease, meningitis and conjunctivitis. There are more than eleven species of *Mycoplasma* that have been isolated from cattle, among them, *M. bovis* is considered the most prevalent in the USA and in some European countries. Therefore, most of the current information comes from case reports and research work on this species.

The general objective of this work was to determine the species of *Mycoplasma* that produce infections in dairy cattle in Argentina and to develop a method of identification of the most prevalent species. For this purpose, a search of the infectious agent was carried out on samples of bulk tank milk, individual cow's milk and calf organs. Then, the organisms were identified to species level and two techniques of MULTIPLEX-PCR were developed, through which *M. bovis*, *M. californicum*, *M. canadense* and *M. leacchi* could be identified in a simple way. This is the first report of isolation of *M. leacchi* from diseased cattle in Argentina. This development will facilitate the characterization of *Mycoplasma* species most frequently isolated from infections in dairy cattle.

I. INTRODUCCION

I. INTRODUCCION

I.1. Agente etiológico

Los microorganismos del genero *Mycoplasma* pertenecen a la clase *Mollicutes* del latín *Molli*: blando y *cutes*: piel (“piel blanda”) y son los procariotas auto replicables más pequeños que existen en la naturaleza. Los mollicutes son considerados parásitos en el hombre, animales, plantas y cultivos de células. Inicialmente fueron llamados organismos tipo pleuroneumonía (PPLO por su sigla en inglés) en vista de su similitud con el agente causante de la perineumonía contagiosa bovina (PCB) (Hayflick, 1965). Estos organismos se distinguen de los demás procariotas por carecer de pared celular, lo que explica algunas propiedades que les son únicas, como la susceptibilidad al choque osmótico, la gran plasticidad celular, que da lugar a la formación de las típicas colonias en forma de “huevo frito” y la extrema sensibilidad a cambios de pH, temperatura, presión osmótica, rayos ultravioletas, agentes tensoactivos, anticuerpos y complemento. Además presentan una marcada resistencia a la acción de antimicrobianos, como β -lactámicos que interactúan directamente en la síntesis del peptidoglucano. Son habitantes de las superficies mucosas respiratoria, urogenital, conjuntival, el tracto gastrointestinal y glándula mamaria, pudiendo causar en bovinos enfermedad respiratoria, otitis, mastitis, artritis, enfermedad reproductiva, meningitis y conjuntivitis (Browning, 2010).

Los *Mycoplasma* son los más pequeños microorganismos de vida libre conocidos, se diferencian de los virus por su capacidad para crecer en medios libres de células, multiplicándose por fisión binaria y son distintos de las bacterias por carecer de pared

celular; sin embargo poseen una membrana celular de tres capas que contiene esteroides, sustancia no hallada en bacterias ni virus, que le confiere soporte estructural. Su biología molecular es intrigante debido a un genoma inusualmente pequeño y una economía genética que requiere una dependencia estricta del huésped para su nutrición y refugio. Debido a su pequeño tamaño (150 a 250 nm) y plasticidad de la membrana, son capaces de pasar a través de membranas de filtros con poros que retienen bacterias. Se consideró por un tiempo que los *Mycoplasma* eran formas L bacterianas (bacterias con pared celular defectuosa); sin embargo estas formas L carecen de esteroides en su membrana y bajo ciertas condiciones pueden revertir a sus formas originales con pared celular (Razin, 1985).

I.2 Clasificación taxonómica

La taxonomía de la clase *Mollicutes* está basada en criterios de requerimientos nutritivos, actividades bioquímicas, morfología y características serológicas. Tabla 1.

El término *Mycoplasmas* o *mollicutes* ha sido utilizado indistintamente desde hace tiempo para nombrar cualquier especie incluida en la clase *Mollicutes*.

En la familia *Mycoplasmataceae*, los géneros *Mycoplasma* y *Ureaplasma* presentan gran importancia por encontrarse asociados a enfermedades en el hombre y animales y en la familia *Acholeplasmataceae*, con el género *Acholeplasma*, las especies *Acholeplasma laidlawii* y *Acholeplasma oculi* forman parte de la microbiota normal del hombre, siendo a su vez capaces de producir enfermedades de características inciertas en los animales (Carter, 1985)

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la clase *Mollicutes* (Brown, 2007).

DOMINIO: <i>Eubacteria</i> PHYLUM: XVI <i>Tenericutes</i> CLASE I: <i>Mollicutes</i>		
ORDEN I: <i>Mycoplasmatales</i>	Familia I: <i>Mycoplasmataceae</i>	Género I: <i>Mycoplasma</i> Género II: <i>Eperythrozoon</i> Género III: <i>Haemobartorella</i> Género IV: <i>Ureaplasma</i>
ORDEN II: <i>Entomoplasmatales</i>	Familia I: <i>Entomoplasmataceae</i>	Género I: <i>Entomoplasma</i> Género II: <i>Mesoplasma</i>
	Familia II: <i>Spiroplasmataceae</i>	Género I: <i>Spiroplasma</i>
ORDEN III: <i>Acholeplasmatales</i>	Familia I: <i>Acholeplasmataceae</i>	Género I: <i>Acholeplasma</i>
ORDEN IV: <i>Anaeroplasmatales</i>	Familia I: <i>Anaeroplasmataceae</i>	Género I: <i>Anaeroplasma</i> Género II: <i>Asteroleplasma</i>
ORDEN V: <i>Incertae sedis</i>	Familia I: <i>Erysipelotrichaceae</i>	Género I: <i>Erysipelothrix</i> Género II: <i>Bulleidia</i> Género III: <i>Holdemania</i> Género IV: <i>Solobacterium</i>

El género *Mycoplasma* cuenta con alrededor de 125 especies, de ellas 12 son encontradas en los animales. Las especies con mayor importancia en el ganado vacuno son: *Mycoplasma bovis* (Mb), *Mycoplasma californicum* y *Mycoplasma bovigenitalium* (Garrity, 2007). Sin embargo, en los últimos años más de 20 especies de *Mycoplasma*, *Ureaplasma* y *Acholeplasma* han sido aisladas de ganado bovino de diferentes cuadros infecciosos. En general se considera que los *Mycoplasma* juegan un papel secundario al exacerbar infecciones pre – existentes. Sin embargo, se ha demostrado que *Mycoplasma bovis* puede tener el rol de agente primario. Si bien Mb es considerada una de las especies más patógenas y la más frecuentemente aislada a partir de neumonías, mastitis y artritis causadas por este género en el ganado vacuno, existen otras especies, como *M.*

californicum, *M. canadense*, *M. bovigenitalium*, *M. alkalescens*, *M. arginini*, *M. bovirhinis*, *M. dispar*, grupo bovino 7 (*M. leachii*) y F-38, que pueden causar infecciones en vacas lecheras. La presencia de estas especies causa problemas en el diagnóstico de rutina, ya que no pueden ser diferenciadas solamente por la morfología de la colonia y realizar una identificación basada en características fenotípicas tales como tests para catabolismo de glucosa y arginina, hidrólisis de urea, actividad fosfatasa y formación de película y mancha (Film and spot). Estas pruebas son extremadamente laboriosas con resultados pocos satisfactorios y certeros (Jasper, 1981, González, 1996).

I.3. Cultivo y características fisiológicas.

Los miembros de la familia *Mycoplasmataceae* se distinguen por presentar características morfológicas y fisiológicas propias. Los *Mycoplasmas* carecen de pared celular y presentan una membrana citoplasmática trilaminar rica en esteroides que les confiere una gran sensibilidad a las variaciones de presión osmótica, acción de solventes orgánicos, alcoholes de cadena larga y otros agentes que afecten la composición de la membrana celular e inducen a la célula a un choque osmótico (Brown, 2007)

La presencia de esteroides en la membrana de estos microorganismos y su incapacidad de biosintetizar los mismos, condiciona uno de sus requerimientos nutricionales más relevantes que es la necesidad de colesterol para su crecimiento y desarrollo, el cual debe estar incorporado en los medios de cultivo libres de células (Razin, 1978). Además de ser incapaces de sintetizar esteroides, los *Mycoplasmas* carecen

de las vías biosintéticas necesarias para la síntesis de ácidos grasos y precursores de los ácidos nucleicos (Brown, 2007); es por ello que en su mayoría se presentan como parásitos de organismos eucariotas asociados a la membrana, tanto a la célula como a los orgánulos citoplasmáticos (Tang, 2000).

I.4. Caracterización e identificación

Los *Mycoplasmas* son microorganismos muy exigentes desde el punto de vista nutricional. Sus requerimientos culturales son muy altos; la mayoría de los *Mycoplasmas* patógenos se desarrollan en medios libres de células. Los medios de cultivo se elaboran adicionándole a la base nutritiva los diferentes suplementos y suero equino, siendo este último la fuente de colesterol requerida para su desarrollo. Estos organismos requieren una atmósfera de 5 - 10% de CO₂ para su cultivo *in vitro*. Las colonias son pequeñas (0,02 – 0,5 mm de diámetro), con el centro granuloso e infiltrado en el agar, recordando la apariencia de un “huevo frito” (Hayflick, 1965).

Entre los métodos para el diagnóstico de la infección por *Mycoplasma* se dispone desde el cultivo, prueba de anticuerpos fluorescentes (FA- ensayo), ELISA, hasta sondas de ADN (Razin, 1994; Hopert, 1993) y cada uno de ellos presenta ciertas ventajas y desventajas. El cultivo de estas especies consume mucho tiempo debido a las condiciones exigentes para su desarrollo, requiriendo medios selectivos como Friis o medio T-*Mycoplasma* de Hayflick para obtener los primo aislamientos (Hayflick, 1965). Por otra parte, la identificación de las principales especies de *Mycoplasma* por

metodología clásica requiere del uso de técnicas muy laboriosas con la adición de suplementos para facilitar el crecimiento *in vitro* (Cerde, 2000, Muñoz, 1990).

Con el fin de superar estas limitaciones se han desarrollado variados procedimientos basados en la tecnología de los ácidos nucleicos. Los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de ciertas regiones de ADN del genoma de *Mycoplasma* han demostrado ser rápidos y específicos para la confirmación de identidad y diferenciación entre especies (Cremonesi,2006; Sung, 2006; Thomas, 2004). En una comparación realizada simultáneamente con otros cuatro métodos de detección utilizados comúnmente (hibridación de ADN-ARN en solución, DAPI tinción de fluorescencia de ADN, la inmunotinción con un anticuerpo monoclonal y un ELISA) se demostró que la PCR produjo significativamente menos resultados falsos negativos o falsos positivos que los otros métodos. (Hopert, 1993). Sin embargo, la existencia de varias especies de *Mycoplasma* determina que deban amplificarse secuencias de ADN muy específicas para poder diferenciar entre ellas. Por lo tanto, es necesario usar cebadores (primers) que hayan sido especialmente diseñados para amplificar la región conservada del ARN ribosomal 16S o las regiones de rRNA 16S-23S encontradas en las especies de *Mycoplasma* (Baird, 1999, Sung, 2006, Wilmotte, 1993).

I.5 Biología molecular y filogenia de la clase *Mollicutes*

Los miembros de la clase *Mollicutes* son los microorganismos procarióticos más pequeños capaces de autoreplicarse, conteniendo la información genética mínima esencial para el desarrollo de la vida (Razin, 1985; Glass, 2006).

El genoma circular de doble cadena de estos microorganismos, con un tamaño promedio de 500 MDa en los géneros *Mycoplasma* y *Ureaplasma*, se caracteriza por su bajo contenido de guanina más citosina (G + C) que oscila entre el 24 - 40 % (Garrity, 2007). La replicación del material genético ocurre de forma similar a otros procariontes, reconociéndose un solo sitio de iniciación y otro de terminación a lo largo del cromosoma bacteriano (Razin, 1985; Fadiel, 2007).

Los ribosomas de estos microorganismos presentan las características típicas de las eubacterias, con un coeficiente de sedimentación de 70S, tres ARN ribosomal (ARNr 5S, 16S y 23S), alrededor de 50 proteínas, las cuales presentan un perfil físico-químico similar a las proteínas ribosómicas de los bacilos Gram positivos. Esto está dado por el alto grado de conservación que poseen los genes de las proteínas ribosómicas en el genoma de los *Mycoplasmas*, sin importar la pequeña capacidad genética del mismo (Razin, 1985).

Los genes mejor caracterizados en la clase *Mollicutes* son los del ARNr, lo cual se explica por varias razones: los genes del ARNr y sus productos están muy conservados, lo cual los convierte en excelentes marcadores para estudios de filogenia; la selección y amplificación de los mismos es relativamente fácil, por lo cual la

amplificación de los genes ribosomales sirve como prueba de detección e identificación de los *Mycoplasmas* en las muestras clínicas. Además, el hecho de que estos genes no se encuentren repetidos en el genoma, permite su utilización para estudios de mecanismos de control de síntesis de los ARNr. La amplificación de la secuencia del espacio 16S-23S es una secuencia altamente conservada en diferentes divisiones y susceptibles de conservarse en la misma familia (Kiyoso, 1993; Razin, 1998).

La secuenciación de los genes, tanto del ARNr, ARNt, proteínas estructurales y genes de enzimas claves en el metabolismo de los *Mycoplasmas*, han brindado una información útil a la hora de establecer las relaciones filogénicas de estos microorganismos (Rocha y Blanchard, 2002). El modelo filogénico más aceptado en la actualidad, establece como antecesores de los mycoplasmas a microorganismos del género *Clostridium*, los cuales eventualmente perdieron la pared celular y sufrieron una reducción del genoma (Razin, 1985). Algunos miembros de la clase perdieron los genes de las enzimas de vías biosintéticas claves para el desarrollo del metabolismo de lípidos y ácidos nucleicos, por lo que comenzaron a evolucionar como simbioses de otros organismos (Brock y Madigan, 2001).

A través de la reacción en cadena de la polimerasa se sintetiza muchas veces un fragmento de ADN utilizando una polimerasa que es activa a temperaturas muy elevadas, ya que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive a altas temperaturas, 79°C a 85°C, de ahí su nombre comercial más conocido: *taq polimerasa*. La realización de una reacción de PCR simula lo que sucede en una célula cuando se sintetiza el ADN, mezclándose en el tubo de reacción todos los componentes necesarios

para hacerlo: la polimerasa, el ADN del organismo a estudiar, donde se encuentra el fragmento que queremos sintetizar; los oligonucleótidos, dinucleótidos y las condiciones para que la enzima sintetice adecuadamente: cierto pH, determinadas cantidades de magnesio en forma de $MgCl_2$, KCl. Esta técnica tiene diversas aplicaciones y se ha convertido en una herramienta muy importante en la biología molecular, aplicándose desde el campo de la genética de poblaciones, evolución molecular y genómica hasta la medicina forense (Bej, 1991).

Existen diferentes métodos de PCR en función de lo que interesa investigar, como son los RAPDs, AFLPs, ISSRs, SSCP, y otros. Podemos dividir la técnica en dos categorías: 1) PCRs para la amplificación de un solo sitio conocido del genoma (locus), estos requieren conocer la secuencia que se trabaja, por ejemplo cuando amplificamos un gen específico como el 16S, en cuyo caso se utilizan oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia de ese gen y se obtiene un solo fragmento de un tamaño ya conocido. Con este tipo de PCRs es posible hacer filogenias y para obtener los datos hay distintos caminos: desde hacer geles especiales que detectan cambios hasta de una sola base entre las secuencias (SSCP), hasta utilizar enzimas de restricción para generar patrones de bandas de cada individuo.

2) PCRs en los que no es necesario conocer la región que se está amplificando, se amplifican regiones no conocidas, como zonas hipervariables del genoma, por lo cual no se sabe el tamaño del fragmento/s. Estos se utilizan para determinar polimorfismos genómico y son los más comunes para *fingerprint*, ya que es sencillo obtener los datos, se observan varios loci simultáneamente y la información de las zonas variables permite

inferir los datos necesarios para análisis de genética de poblaciones. Existen zonas repetidas hipervariables del ADN que pueden amplificarse de esta manera, como los sitios que sirven para iniciar la síntesis de ADN en los cromosomas conocidos como micro satélites (Bej, 1991 y Dieffenbach, 1995).

I.6 Diagnóstico de infecciones causadas por *Mycoplasma*

En general, en el ganado lechero se puede presentar mastitis clínica resistente a la terapia antibiótica con la participación de varios cuartos mamarios, a veces los cuatro, acompañado de una marcada caída de producción láctea y secreciones anormales de la glándula mamaria que pueden variar desde leche con algunos coágulos hasta aspecto tipo calostro. Las vacas crónicamente infectadas pueden tener una secreción con sedimentos arenosos, secreciones purulentas que pueden durar varias semanas. Las vacas que siguen en lactación producen menos leche de lo esperado para la lactancia en curso, por lo general con apariencia normal pero con altos recuentos de células somáticas. Pueden detectarse *Mycoplasma* en forma intermitente durante períodos variables (Gonzalez, 1996).

El contagio se efectúa de un animal a otro y en algún punto el animal se convierte en portador de la bacteria, transformándose en fuente de eliminación de la misma en el tambo. Durante el ordeño el contagio se produce de vaca a vaca, comportándose como una bacteria contagiosa. (Gonzalez, 2003; Fox, 2005).

Estos organismos no son exclusivos de la glándula mamaria y pueden causar afección tanto en terneros como en vacas. Normalmente habitan en las superficies mucosas, incluyendo las de los sistemas respiratorio, urogenital y gastrointestinal, los ojos y la glándula mamaria. En terneros puede causar problemas respiratorios, articulares, nerviosos y otitis. La infección respiratoria se transmite por medio de secreciones respiratorias infectadas y el germen llega al tracto respiratorio a través de pequeñas gotas aerosolizadas procedentes de un contacto cercano. Las enfermedades por *Mycoplasmas* tienen un periodo de incubación de aproximadamente 2 a 3 semanas. En casos de cuadros de artritis, estos pueden afectar una sola articulación o varias (Maunsell, 2009).

En vacas también produce problemas reproductivos pudiendo llegar a dar abortos, vulvovaginitis con granulaciones o pápulas en la mucosa vaginal y descarga que puede ser hasta purulenta en vacas adultas. Los *Mycoplasma* pueden causar infecciones de los órganos reproductivos del toro y aislarse del semen en forma intermitente (Gonzalez, 2003).

I.7 Mastitis por *Mycoplasma*

La prevalencia de mastitis asociada a *Mycoplasma* ha sido reportada en todo el mundo tendiendo a ir en aumento (Fox, 2003). La enfermedad es altamente contagiosa, generando daño al tejido mamario, disminución de la producción de leche, alteración en la secreción láctea y eventual descarte de los animales infectados. Con frecuencia, este tipo de infecciones mamarias no son adecuadamente diagnosticadas y reconocidas, con

la posible difusión de este organismo a través de la venta de vacas infectadas. Además, el tratamiento de enfermedades por *Mycoplasma* es difícil, ya que estos organismos al carecer de pared celular, resisten a los antibióticos beta lactámicos, cuyo uso es muy frecuente en medicina veterinaria (González and Wilson, 2003).

El aislamiento de *Mycoplasma bovis* fue informado por primera vez en Argentina en el año 2000 partir de un brote de mastitis que no respondía a la terapia antibiótica en un tambo de la provincia de Buenos Aires (Cerdá, 2000), aunque solo recientemente se ha comenzado a realizar diagnóstico de esta infección en forma rutinaria en nuestro país. Si bien existen más de once especies de *Mycoplasma* aisladas de bovinos, *M. bovis* se considera la más prevalente en los EE.UU. y en algunos países de Europa. Por lo tanto, la mayoría de la información actual proviene de reportes de casos y trabajos de investigación realizados sobre esta especie. Sin embargo, solamente alrededor del 30% de los aislamientos que se han obtenido en los últimos tres años en nuestro país pertenecen a esta especie (Neder, 2013). Esto determina la necesidad tanto de profundizar los estudios acerca de las especies de *Mycoplasma* causantes de infección intramamaria en nuestro país como de desarrollar metodologías diagnósticas que contribuyan a una adecuada identificación de las mismas.

La mastitis por *Mycoplasma* produce alto impacto económico en los rodeos, ya que es altamente contagiosa, no existen tratamientos eficaces en los animales y su prevalencia en los rodeos no está claramente establecida. Por lo tanto, una identificación rápida es crítica para permitir la segregación de los animales infectados a los efectos de

prevenir la propagación de la infección y preservar la salud del rodeo lechero. Consecuentemente, contar con un método de diagnóstico efectivo para diferenciar las especies prevalentes en nuestro país permitirá mejorar los programas de control de esta enfermedad y fortalecerá los estudios epidemiológicos que se realicen sobre este organismo.

I.8.Objetivos

Objetivo general:

- Determinar la presencia de especies de *Mycoplasma* que producen infecciones en ganado bovino en Argentina y desarrollar métodos de identificación de las especies aisladas.

Objetivos específicos:

- Obtener aislamientos de *Mycoplasma* spp provenientes de muestras de leche de tanque, de vacas con mastitis clínica, subclínica y de distintas patologías en terneros.
- Identificar las distintas especies de *Mycoplasma* aisladas por metodología molecular.
- Desarrollar un método de PCR-simple para la detección de la familia *Mycoplasmataceae*.
- Desarrollar una metodología de multiplex PCR para tipificar las distintas especies aisladas con mayor frecuencia de bovinos.

I.9.Hipotesis

Existe escasa información acerca de las especies de *Mycoplasma* spp. que causan infección en el ganado lechero en Argentina. El desarrollo de pruebas tipo multiplex

PCR facilitará la identificación de las especies del genero *Mycoplasmas* con elevada frecuencia de aislamiento de infecciones en ganado lechero.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Los *Mycoplasma* son los microorganismos más pequeños de vida libre conocidos, carecen de pared celular y se diferencian de los virus por su capacidad para crecer en medios libres de células. Poseen un genoma inusualmente pequeño que va de 600 a 2300 kb y una economía genética que requiere una dependencia estricta del hospedador para su nutrición y refugio. El pequeño tamaño de su genoma impone requerimientos nutricionales complejos, así como la dependencia de fuentes externas de precursores biosintéticos tales como aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos y esteroides (Razin, 1978). La composición de las bases del ADN mycoplásmico es también excepcional, poseen un bajo contenido de dominios guanina- citosina (G+C) a semejanza de sus ancestrales bacterias Gram positivas. Presentan además diferencias en la composición de sus codones, resaltando la presencia del codón TGA para codificar el triptófano a una frecuencia 10 veces mayor a la usual (Razin, 1978). Filogenéticamente derivan de un subgrupo de bacterias Gram positivas (*Bacillus*, *Lactobacillus*, *Clostridium* y, principalmente, *Streptococcus*) de las que divergieron hace 600 millones de años mediante un largo proceso de evolución reductiva que llevó a la pérdida de la pared celular y a una acusada reducción gradual del genoma. Este proceso reductivo determinó las características biológicas que los hace únicos entre el resto de las bacterias, así como su comportamiento con el hospedador (Hayflick, 1965).

Las infecciones relacionadas con la especie *Mycoplasma* pueden inducir a una variedad de problemas en los organismos vivos, así como en los cultivos celulares *in*

vitro. La infección por *Mycoplasma* puede difundirse por secreciones respiratorias vía aerosoles, y contacto entre hocicos de terneros infectados (Madoff, 1979; Maunsell, 2011) o puede ocurrir por vía interna desde una mucosa colonizada o transmisión entre animales (Fox, 2004, Maunsell, 2011). La posibilidad de transmisión de este microorganismo a través del consumo de leche bovina infectada es otra posibilidad de infección (Butler, 2000, Maunsell, 2011).

Existen más de 11 especies de *Mycoplasma* que se han aislado de bovinos, entre ellas, *M. bovis* se considera la más prevalente en los EEUU y en algunos países de Europa. Otras especies de *Mycoplasma* han sido también aislados de casos de mastitis; entre ellas, *Mycoplasma alkalescens*, *M arginini*, *M canadense*, *M californicum* y *M. bovis genitalium*. La identificación de las especies de *Mycoplasma* causantes de infección mamaria requiere de pruebas de PCR que se realizan a partir de las colonias presuntamente identificadas como *Mycoplasma* spp (Hirose, 2001). *Mycoplasma bovis* es la especie patógena causante de pérdidas económicas significativas en el ganado bovino que ha sido aislada en los países libres de perineumonía contagiosa bovina. Por su participación en distintos cuadros infecciosos, *Mycoplasma bovis* es un patógeno trascendente; sin embargo, su prevalencia es subestimada por falta de diagnóstico. Se encuentra difundido en todo el mundo y su presencia ha sido diagnosticada en Irlanda y países de América del Sur en la última década. En Europa, es responsable de al menos un cuarto a un tercio de los casos de neumonía en terneros, aunque estas cifras puede

estar subestimadas, ya que pocos laboratorios hacen diagnóstico regularmente para *Mycoplasma* (Nicholas, 2003).

Aunque los mecanismos de patogénesis, son poco conocidos, la adhesión, la variación antigénica, y la invasión son imprescindibles para el éxito de la colonización de *M. bovis*. Las infecciones por *M. bovis* a menudo siguen un curso crónico (Browning, 2010). Las lipoproteínas variables de superficie (VSP) juegan un papel crucial en la evasión del sistema inmune. Estas VSPs exhiben frecuentes cambios de tamaño y variación de fase que contribuyen a la naturaleza crónica de las infecciones por *M. bovis* (Beier, 1998).

La presencia de mastitis asociada a *Mycoplasma* ha sido reportada en todo el mundo, en nuestro país se han aislado organismos del género *Mycoplasma* en casos de neumonías en terneros (Almeida, 1982) y en bovinos adultos a partir de casos de mastitis y semen (Cerdá, 2000; Bigatti, 2010). En un estudio realizado en Bélgica en leche de tanque, sobre 200 tambos que pertenecían a una población de 6.287 productores de leche de Flandes, MB fue aislado de tres tambos (1.5%) (Passchyn, 2012). En un ensayo bianual realizado en los EEUU también en leche de tanque el porcentaje de muestras positivas pareció aumentar de forma constante durante el periodo de tiempo del estudio, de 2% a 6% (Fox, 2003) y se lo ha detectado en menos del 1% de los tambos en el sudoeste de Francia utilizando 345 muestras de leche de tanque (Arcangiolia, 2011). En 71 muestras de leche de tanque provenientes de tambos del sur de Chile, se lo detectó en un 7% (Sickles, 2000) y en un estudio realizado en Portugal en 164 explotaciones

lecheras, cinco tambos fueron positivos en la leche de tanque; en cuatro de los cuales (2,4 %) se aisló MB, mientras que en el restante (0,6 %) *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*. Los tamaños de los establecimientos ganaderos donde se detectó presencia de *Mycoplasma* spp variaron de 37 vacas en lactación a 143 con un recuento de células somáticas del tanque entre 180.000 células/ml a 320.000 células/ml (Pinho, 2013). En un relevamiento realizado sobre 129 establecimientos lecheros seleccionados ubicados en los Departamentos Castellanos y Las Colonias de la Provincia de Santa Fe, no se detectó este patógeno en las muestras de leche de tanque (Neder, 2014). Sin embargo en los últimos años en Argentina se han informado aislamientos tanto de muestras de leche de tanque, cuartos mamarios y órganos de terneros a partir de casos en los cuales se sospechaba la presencia de este organismo (Allassia, 2012; Neder, 2013). En muestras de cuartos mamarios provenientes de casos de mastitis clínica bovina en el norte de Grecia, se detectó *M. bovis* en 18/219 (8,2%) de los casos (Filioussis, 2007). Sin embargo, en un estudio realizado en Australia, *M. bovis* se detectó en el 77% de las vacas, de las cuales el 19% solo tuvo *M. bovis* sin asociación con otra bacteria, el 17 % tuvieron *M. bovis* en combinación con los principales patógenos causantes de mastitis y el 40 % tuvieron *M. bovis* en combinación con bacterias ambientales (Ghadersohi, 1999). Paralelamente, en los Países bajos se observó el incremento de infecciones por *M. bovis*, detectándolo en el 71% de las vacas, de las cuales el 20% eran vacas lecheras y el 80 % restante eran vacas de engorde (Laak, 1992).

Existen otras especies de *Mycoplasma spp* que causan enfermedades en los bovinos; como se evidencia en el estudio evaluado por Pinho (2013) en el cual se detectó en forma simultanea la presencia de *Mycoplasma bovis* y *Mycoplasma canadense* en 2/164 muestras de leche de tanque, mientras que en una de las 164 (0.6%) se halló *Mycoplasma capricolum subsp. capricolum*. Además, *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides*, *M. bovis*, *M. alkalescens*, *M. bovis*, *M. dispar* son los agentes causantes de diversas enfermedades en vacas y terneros, como mastitis, neumonía, artritis, desordenes genitales y abortos. *Mycoplasma bovirhinis* es un agente problemático como invasor secundario en las enfermedades respiratorias y es el más comúnmente aislado de la cavidad nasal de ganado bovino con enfermedades respiratorias (Hirose, 2001, Miles, 2004).

Hasta la fecha, el cultivo sigue siendo el “estándar de oro” para el diagnóstico de *Mycoplasma spp.*; sin embargo pocos laboratorios realizan el cultivo debido a la naturaleza exigente del microorganismo, la necesidad de agregar un 5-10% de CO₂ y el mayor tiempo de incubación. Para superar las limitaciones del cultivo se ha utilizado la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el diagnóstico; sin embargo los ensayos de PCR desarrollados tienen poca sensibilidad para diferenciar entre especies cuando éstas están estrechamente relacionadas (Baird, 1999; Hirose, 2001).

III MATERIALES Y METODOS

III - Materiales y Métodos

III.1. Muestras

Se procesaron un total de 1548 muestras, de las cuales 107 procedieron de leche de tanque de frío, 1412 de leche de vacas individuales y 29 de diversos órganos de terneros de casos sospechosos de infecciones por *Mycoplasma* spp. Estas muestras fueron remitidas al Laboratorio de Microbiología de la EEA Rafaela de INTA durante enero de 2009 a julio de 2016 por sospechar la presencia de este organismo como agente etiológico de casos de enfermedad en ganado bovino. Las muestras provinieron de establecimientos ganaderos ubicados en la cuenca lechera central de la República Argentina; Santa Fe (Clason, Carlos Pellegrini, Esperanza, Humboldt, Arrufó), Córdoba (Balnearia, Marcos Juárez), y Buenos Aires (Balcarce, Tandil).

III. 2 Cepas de *Mycoplasma*

III. 2.1 Cepas bacterianas: Se utilizó cepa de referencia de la “Colección de Cultivos Tipo Americano” (ATCC, siglas en inglés) de *M. bovis* (ATCC 25025).

III. 2.2 Condiciones de cultivo: Para su procesamiento las muestras se sembraron en medio de cultivo Hayflick’s modificado (Merck) a 37°C, en atmósfera de CO₂ al 10% durante 7 a 10 días (Hayflick, 1965). Se preparó mediante disolución de sus componentes en agua bidestilada y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15

minutos. Los componentes sensibles al proceso de esterilización fueron adicionados luego de esterilizar el medio base *Mycoplasma*. La composición y utilidad del medio se detalla en la tabla 2.

Tabla 2. Medio de cultivo de Hayflick's modificado (500 ml).

Ingredientes	Cantidades
Medio Mycoplasma deshidratado	12.5 gr.
Suero de caballo	100 ml.
Extracto de levadura 18%	50 ml.
DNA Calf Thymus 0.2%	6 ml.
Acetato de Talio 1%	5 ml.
Penicilina 200.000IU	2.5 ml.
Agua destilada	350 ml.

III. 2.3 Conservación de cepas de *Mycoplasma*

Las colonias sospechosas de *Mycoplasma* identificadas sobre la base de su morfología observada al microscopio con un aumento de 4x, se transfirieron a crioviales de 2 ml que contenían un volumen igual de medio líquido de Hayflick's modificado suplementado con glicerol 15% (v/v). Se mezcló y conservó a -80°C (Vyletelova, 2010).

III. 2.4 Extracción de ADN genómico

Se realizó la extracción de ADN a partir de una alícuota de 200 µl del primo cultivo conservado a -80°C, mediante el procedimiento descrito por Thomas y col

(2004) modificado y por Hernandez y col. (2009). El primer paso consistió en reactivar la cepa en 2 ml de caldo de Hayflick's modificado durante 24-48hs a 37°C en atmósfera controlada de CO₂ al 10%, seguidamente concentrar por centrifugación a 14.000 xg durante 10 minutos, lavar dos veces sucesivas con solución de PBS con el objeto de eliminar componentes del medio de cultivo cuya presencia pudiera afectar la reacción de PCR posterior. Centrifugar nuevamente y re suspender el pellet de células en 40 µl de PBS. El producto fue sometido a calentamiento a 100°C por 10 minutos, seguido de un enfriamiento a - 20°C por 10 minutos, luego se lo sometió nuevamente a centrifugación a 12.000 xg por 2 minutos, permitiendo la formación de dos fases. Una fase superior acuosa donde se encuentran presentes ácidos nucleicos y una fase inferior en la cual se encuentran presentes fragmentos celulares. La fase superior fue cuidadosamente recuperada y trasvasada a un microtubo estéril libre de nucleasas, en el cual se conservaron a -20 °C hasta su uso.

III.2.5. Purificación de ADN para secuenciar

La purificación de los productos de PCR para secuenciar se efectuó añadiendo un volumen igual de solución de unión de membrana al producto de amplificación de PCR. Mediante el uso de una minicolumna de montaje, se transfirió el preparado a la minicolumna incubándose a temperatura ambiente por 1 minuto. Seguido, se centrifugó a 16.000 xg por 1 minuto. Se adicionaron 700 µl de solución de lavado de membrana (que contiene etanol), nuevamente se centrifugó a 16.000 xg por 1 minuto, se descartó el líquido, se repitió el lavado con 500 µl de solución de lavado y se centrifugó por 5

minutos. Se vació el tubo colector y se centrifugó por 1 minuto con tapa abierta para permitir la evaporación de algún residuo de etanol. Se transfirió cuidadosamente la minicolumna a un tubo de centrífuga limpio de 1,5 ml, se adicionaron 50 μ l de agua libre de nucleasas y se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto, posteriormente centrifugando a 16.000 xg por 1 minuto. Luego se desechó la minicolumna, y se retuvo el líquido en la parte inferior conteniendo el ADN purificado, el cual se conservó a 4°C o -20°C (Figura 1).

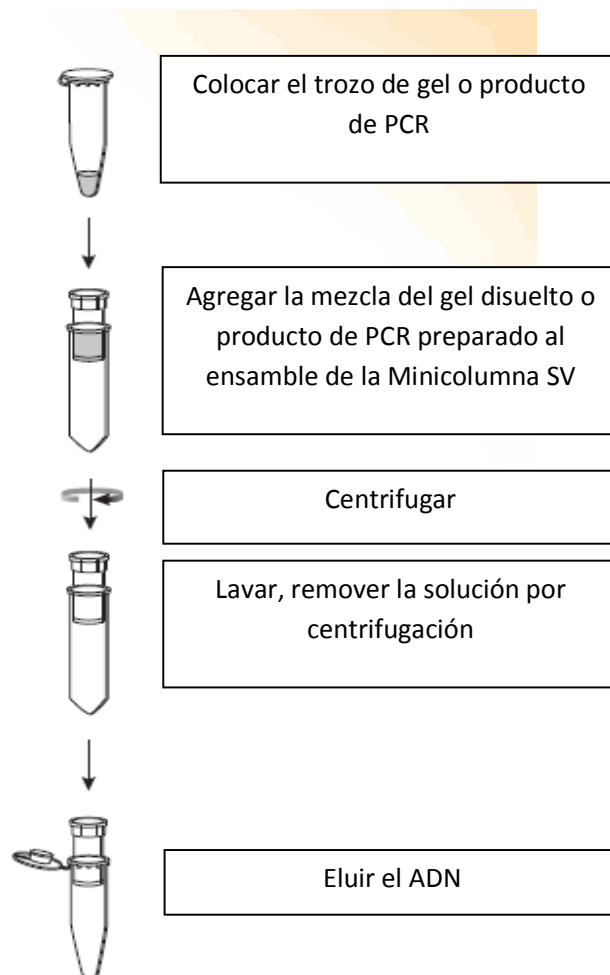


Figura 1: Esquema del dispositivo comercializado por Promega para purificar ADN.

III.2.6. Secuenciación de los fragmentos amplificados.

Para determinar la secuencia de los fragmentos de ADN obtenidos por PCR (Ver III.3.1.1), luego de su purificación, se procedió a la secuenciación de ADN, de siete cepas en el Instituto de Biotecnología del C.I.C.V y A INTA Castelar (Bs. As), en un secuenciador ABI3130xl (Applied Biosystems).

III.2.7. Análisis de las secuencias y Diseño de primers

Las secuencias obtenidas se analizaron en BIODIT. Las comparaciones con las secuencias existentes se hicieron en una interfaz de Windows para el programa de alineación de secuencias múltiples Clustal X. Obtenidas las secuencias de interés, se procedió al diseño de primers con FastPCR, corregidos en forma manual (Ver Anexo I).

III.2.8. Soluciones utilizadas en los estudios moleculares

- Solución reguladora TAE 50 X (1000ml): Pesar 242 grs Tris base, 18.6 grs EDTA, ajustar el pH a 7.7 con Ac. Acético glacial. Enrasar el volumen a 1 lt con agua destilada.
- Solución de reguladora TAE 1X (500ml): Tomar 10 ml de la solución TAE 50X y llevarlo a volumen final 500 ml con agua destilada.
- Buffer fosfato PBS pH 7.4 (1000ml): Pesar 8 grs ClNa, 0.2 grs KCl, 1.44 grs Na₂HPO₄, 0.24 grs. KH₂PO₄, ajustar a pH 7.4 con HCl y llevar a volumen final.

- Gel Red™ 10.000X: 1: 10.000 en gel de agarosa, colocar 3 µl de Gel Red™ 10.000X en 30 ml de solución de gel.

III. 3 Procedimientos para la amplificación del ADN.

III. 3.1 Método de la PCR-Simple para la detección de la clase *Mollicutes*

III.3.1.1 Primers

Para realizar la PCR genérica de la clase *Mollicutes* se seleccionaron los cebadores Flank F1 y Flank R1, complementarios a un fragmento del gen ARNr 16S de la clase *Mollicutes* descrito por Wilmotte y col. (1993) y Baird y col. (1999). Tabla 3.

Tabla 3: Secuencias de oligonucleótidos usados en la detección de *Mycoplasma*.

Especificidad	Cebadores	Secuencia de nucleótidos (5' – 3')	Tm (C°)	Peso del fragmento (pb)
Clase <i>Mollicutes</i>	FlankF1	ACACCATGGGAGCTGGTAAT	56.2	488
	FlankR1	CTTCATCGACTTTCAGACCCAAGGCAT	60.6	

Tm: temperatura de *melting*

pb: pares de bases.

III. 3.1.2 Programa de amplificación

Según lo descrito por Baird y col. (1999) se siguió el siguiente programa de amplificación que se detalla en la Tabla 4, para una PCR específica a la clase *Mollicutes*.

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador MyGene L Series Peltier Thermal Cyclor (Long Gene).

Tabla 4: Programa PCR para amplificar un fragmento de ADN específico de la clase *Mollicutes*.

Etapas	Temperaturas y tiempos	Ciclos
Desnaturalización	94°C por 45 segundos	1
Desnaturalización	94°C por 30 segundos	35
Hibridación	55°C por 2 minutos	
Extensión	72°C por 1 minutos	
Extensión	72°C por 5 minutos	1

III. 3.1.3 Mezcla de reacción

Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 µl conteniendo la siguiente mezcla de reactivos (Productos Bio-Lógicos): 2.5 µl de buffer termofílico 10X, 2 mM de MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP, 0,03 µM de cada uno de los oligonucleótidos sentido y anti sentido, 1,25 U de Taq ADN polimerasa y 50 ng de ADN genómico, siguiendo el programa de ciclado detallado en la Tabla 4. En todas las reacciones se realizaron controles negativos utilizando una mezcla formulada de igual manera a lo descrito anteriormente, pero reemplazando el volumen de ADN molde por agua bidestilada estéril.

III. 3.1.4 Análisis de los productos de amplificación

Para la evaluación de los productos de ADN obtenidos se sembraron las muestras en la proporción correspondiente de buffer de muestra 6X en geles al 1,5% de agarosa. Los geles fueron preparados en buffer TAE 1X, adicionándose GelRed™ 10.000X (Biotium, Inc) a una concentración final 1X. Las corridas electroforéticas se realizaron en cubas horizontales (BioRad) en el mismo buffer a 90 V (Voltaje constante). Como marcadores de tamaño se utilizó una mezcla de fragmentos de ADN de tamaño escalonado (50 pb plus ladder, Productos Bio-Lógicos). Los fragmentos de ADN resueltos en el gel se visualizaron en un transiluminador de luz UV (λ 255 nm) (DNR, Bio - Imaging Systems).

III. 3.2 Método de la PCR-Simple para la identificación de *M. bovis*.

III. 3.2.1 Primers

Para este método fueron seleccionados juegos de cebadores MBOUVR C2-L y MBOUVR C2-R previamente reportados por Thomas *et al*, (2003); que amplifican una región conservada del gen *uvrC*, el cual es específico para *M. bovis*. Tabla 5.

Tabla 5: Secuencias de oligonucleótidos usados en la detección de *Mycoplasma bovis*.

Especificidad	Cebadores	Secuencia de nucleótidos (5' – 3')	Tm (C°)	Peso del fragmento (pb)
<i>Mycoplasma bovis</i>	MBOUVR C2-L	TTACGCAAGAGAATGCTTCA	56.2	1626
	MBOUVR C2-R	TAGGAAAGCACCTATTGAT	60.6	

Tm: temperatura de fusión (*melting*)

pb: pares de bases.

III. 3.2.2 Programa de amplificación

Según lo descrito por Thomas *et al* (2003) se siguió el siguiente programa de amplificación que se detalla en la Tabla 6, para una PCR específica a *M. bovis*. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador MyGene L Series Peltier Thermal Cycler (Long Gene).

Tabla 6: Programa PCR para amplificar un fragmento de ADN específico de *Mycoplasma bovis*

Etapas	Temperaturas y tiempos	Ciclos
Desnaturalización	94°C por 2 minutos	1
Desnaturalización	94°C por 30 segundos	35
Hibridación	52°C por 30 segundos	
Extensión	72°C por 90 segundos	
Extensión	72°C por 5 minutos	1

III. 3.2.3 Mezcla de reacción

En todas las reacciones las mezclas se realizaron de igual manera a lo descrito en el apartado III.3.1.3., siguiendo el programa de ciclado detallado en la tabla 6. En todas las reacciones se realizaron controles negativos utilizando una mezcla formulada de igual manera a lo descrito anteriormente, pero reemplazando el volumen de ADN molde por agua bidestilada estéril y controles positivos usando el ADN molde de *M. bovis* ATCC 25025.

III. 3.2.4 Análisis de los productos de amplificación

Para la evaluación de los productos de ADN obtenidos se sembraron las muestras en la proporción correspondiente de buffer de muestra 6X en geles al 1,2% de agarosa. Los geles fueron preparados en buffer TAE 1X, adicionándose GelRed™ 10.000X (Biotium, Inc) a una concentración final 1X. Las corridas electroforéticas se realizaron en cubas horizontales (BioRad) en el mismo buffer a 90 V. Como marcadores de tamaño se utilizó una mezcla de fragmentos de ADN de tamaño escalonado (100 bp ladder, Productos Bio-Lógicos). Los fragmentos de ADN resueltos en el gel se visualizaron en un transiluminador de luz UV (λ 255 nm) (DNR, Bio - Imaging Systems).

III. 3.3 Método de Multiplex-PCR para la identificación de *M. bovis* y *M. canadense*

III. 3.3.1 Primers

Para este método fueron seleccionados dos juegos de cebadores complementarios (Tabla 7), el UVRf – UVRr para *M. bovis* y el canadF y candR para *M. canadense*. Los pares de primers para *M. canadense* fueron diseñados a partir de la secuencia seleccionada de la región conservada del 16S según el ítem III.2.6 y III.2.7.

Tabla 7: Secuencias de oligonucleótidos usados en la detección de *M. bovis* – *M. canadense*

Especificidad	Cebadores	Secuencia de nucleótidos (5' – 3')	Tm (C°)	Peso del fragmento(pb)
<i>Mycoplasma bovis</i>	UVR F	TTACGCAAGAGAATGCTTCA	56.2	1626
	UVR R	TAGGAAAGCACCTATTGAT	60.6	
<i>Mycoplasma canadense</i>	CANDf	GCGGAACATTAGTTAGTTGGTA	58.9	623
	CANDr	CGTTAGCTGCGTCAGTGAATT	60.6	

Tm: temperatura de *melting*

pb: pares de bases.

III. 3.3.2 Programa de amplificación

Conociendo el tamaño de los fragmentos a amplificar y las Tm de cada cebador, se diseñó el siguiente programa (tabla 8), para amplificar por una PCR-Multiplex las dos especies en estudio. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador MyGene L Series Peltier Thermal Cycler (Long Gene).

Tabla 8: Programa PCR para *M. bovis* – *M. canadense*.

Etapas	Temperaturas y tiempos	Ciclos
Desnaturalización	94°C por 2 minutos	1
Desnaturalización	94°C por 30 segundos	30
Hibridación	54°C por 30 segundos	
Extensión	72°C por 60 segundos	
Extensión	72°C por 5 minutos	1

III. 3.3.3 Mezcla de reacción

En todas las reacciones se realizaron las mezclas de igual manera a lo descrito en el apartado III.3.1.3 siguiendo el programa de ciclado detallado en la tabla 8. En todas las reacciones se realizaron controles negativos utilizando una mezcla formulada de igual manera a lo descrito anteriormente, pero reemplazando el volumen de ADN molde por agua bidestilada estéril.

III. 3.3.4 Análisis de los productos de amplificación

Para la evaluación de los productos de ADN obtenidos se sembraron las muestras en la proporción correspondiente de buffer de muestra 6X en geles al 1,5% de agarosa. Los geles fueron preparados en buffer TAE 1X, adicionándose GelRed™ 10.000X (Biotium, Inc) a una concentración final 1X. Las corridas electroforéticas se realizaron en cubas horizontales (BioRad) en el mismo buffer a 90 V. Como marcadores de tamaño se utilizó una mezcla de fragmentos de ADN de tamaño escalonado (100 bp ladder,

Productos Bio-Lógicos). Los fragmentos de ADN resueltos en el gel se visualizaron en un transiluminador de luz UV (λ 255 nm) (DNR, Bio - Imaging Systems).

III .3.4 Método de Multiplex-PCR para la identificación de *M. californicum* y *M. leachii*.

III .3.4.1 Primers

Para este método fueron seleccionados dos juegos de cebadores complementarios (Tabla 9), el CalifF – CalifR para *M. californicum* y el mycoF - mycoR para *M. leachii*.

Tabla 9: Secuencias de oligonucleótidos usados en la detección de *M. californicum* – *M. leachii*

Especificidad	Cebadores	Secuencia de nucleótidos (5' – 3')	Tm (C°)	Peso del fragmento (pb)
<i>Mycoplasma californicum</i>	Calif F	CCACCAAGGCAATGATGTT	58	490
	Calif R	TGTCAGTATATGTCCAGTTAGC	58.9	407
<i>Mycoplasma leachii</i>	MycoF	GCCGAACTGAGAGGTTGAT	60.2	266
	MycoR	ATAACGCTTGCCACCTATGT	58.4	

Tm: temperatura de *melting*

pb: pares de bases.

III. 3.4.2 Programa de amplificación

Conociendo el tamaño de los fragmentos a amplificar y las Tm de cada cebador, se diseñó el siguiente programa (tabla 10), para amplificar por una PCR-Multiplex las dos especies en estudio. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador MyGene L Series Peltier Thermal Cycler (Long Gene).

Tabla 10: Programa PCR para *M. californicum* – *M. leachii*.

Etapas	Temperaturas y tiempos	Ciclos
Desnaturalización	94°C por 2 minutos	1
Desnaturalización	94°C por 20 segundos	30
Hibridación	59°C por 30 segundos	
Extensión	72°C por 60 segundos	
Extensión	72°C por 5 minutos	1

III. 3.4.3 Mezcla de reacción: En todas las reacciones las mezclas se realizaron de igual manera a lo descrito en el apartado III.3.1.3., siguiendo el programa de ciclado detallado en la tabla 9. En todas las reacciones se realizaron controles negativos utilizando una mezcla formulada de igual manera a lo descrito anteriormente, pero reemplazando el volumen de ADN molde por agua bidestilada estéril.

III. 3.4.4 Análisis de los productos de amplificación.

Para la evaluación de los productos de ADN obtenidos se sembraron las muestras en la proporción correspondiente de buffer de muestra 6X en geles al 1,5% de agarosa. Los geles fueron preparados en buffer TAE 1X, adicionándose GelRed™ 10.000X (Biotium, Inc) a una concentración final 1X. Las corridas electroforéticas se realizaron en cubas horizontales (BioRad) en el mismo buffer a 90 V. Como marcadores de tamaño se utilizó una mezcla de fragmentos de ADN de tamaño escalonado (100 bp ladder, Productos Bio-Lógicos). Los fragmentos de ADN resueltos en el gel se visualizaron en un transiluminador de luz UV (λ 255 nm) (DNR, Bio - Imaging Systems).

IV RESULTADOS

IV. RESULTADOS

IV.1 Aislamiento e identificación preliminar.

Del total de muestras procesadas 41 cepas fueron identificadas como *Mycoplasma* spp., el origen de las muestras de las cuales se los aisló fueron: de 10 leches de tanque, 26 muestras de leche de vaca, 1 líquido articular de vaca, 1 absceso mandibular de vaca, 1 líquido articular de ternero y 1 muestra de tarso izquierdo de ternero.

A partir de los primos cultivos en el medio de Hayflick's modificado, las colonias típicas de microorganismos pertenecientes al género *Mycoplasmas*, son muy pequeñas con un tamaño de 20 a 100 μm , casi imperceptibles en el medio y evidenciadas como cabezas de alfiler. Microscópicamente tienen una apariencia típica semejante a "huevo frito" debido a que las bacterias crecen dentro del medio de cultivo. En base a las características microscópicas y macroscópicas de las colonias los microorganismos fueron identificadas como pertenecientes al género *Mycoplasma*. Figura 2 y 3.

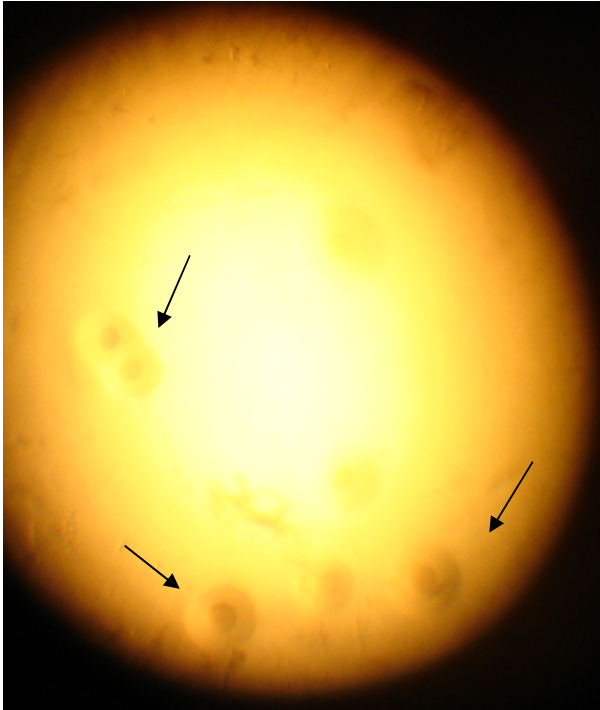


Figura 2: Microfotografía de colonias de *Mycoplasma* con la típica formación en “huevo frito”.
Aumento 4X.



Figura 3: Placa con medio de cultivo con crecimiento de bacterias *Mycoplasma spp.*

IV. 2. Identificación molecular mediante PCR genérica.

La identificación preliminar de los aislamientos se confirmó mediante la técnica molecular de PCR genérica (Tabla 3).

Todos los aislamientos fueron confirmados como pertenecientes al género *Mycoplasma* por presentar un producto de amplificación de 488 pb correspondiente a la Clase *Mollicutes* (Figura 4).

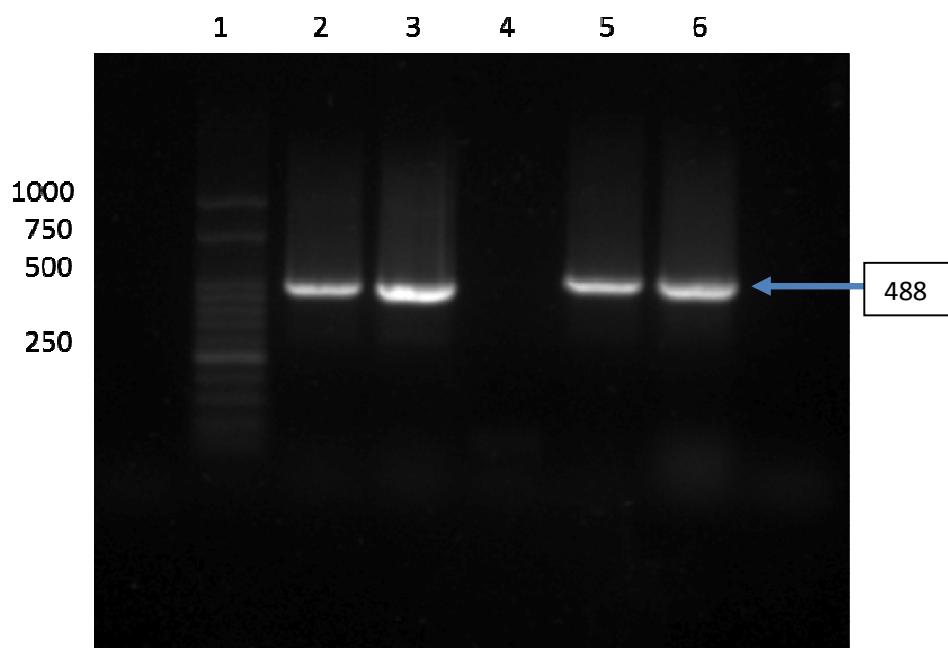


Figura 4: Productos de amplificación de los aislamientos correspondientes a la clase *Mollicutes*. Línea 1: Marcadores de tamaño de fragmento (50 pb plus ladder, Productos Bio-logicos), Línea 2-3 y 5: aislamientos 13, 14 y 33; Línea 4: Control negativo; Línea 6: *Mycoplasma bovis* ATCC 25025.

IV.3. Identificación molecular de *Mycoplasma bovis* por amplificación de su secuencia conservada.

La amplificación de la secuencia del gen *uvr* de *Mycoplasma bovis* permitió diferenciar del ensayo aquellos aislamientos nativos cuyo patrón fenotípico fue idéntico al de la cepa de referencia *Mycoplasma bovis* ATCC 25025.

De las 41 cepas evaluadas, 3 una banda correspondiente a la amplificación del gen *uvr*, coincidente con el exhibido por la cepa de referencia (Figura 5).

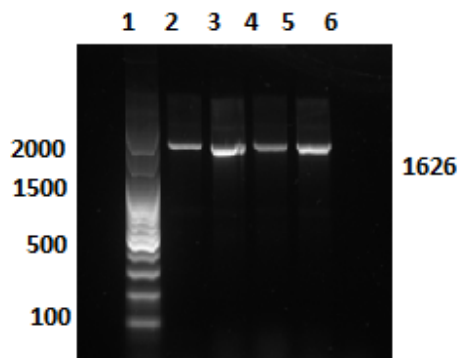


Figura 5: Productos de amplificación del fragmento codificante *uvr* de *Mycoplasma*
Líneas 1: Marcadores de tamaño de fragmento (100 pb ladder, Productos Bio-Logicos); Línea 2, 3 y 4: producto de la reacción de PCR a partir de ADN genómico de cepas incógnitas de *Mycoplasma* spp; Línea 5: producto de la reacción de PCR a partir de ADN genómico de la cepa *Mycoplasma bovis* ATCC 25025; Línea 6: control negativo.

IV.4. Identificación molecular de aislamientos diferentes a *Mycoplasma bovis*.

Treinta y siete aislamientos fueron identificados a nivel de especie, 31 pertenecieron a *M. leachii* y 6 a *M. californicum*, según la amplificación de sus regiones conservadas (Figura 6).

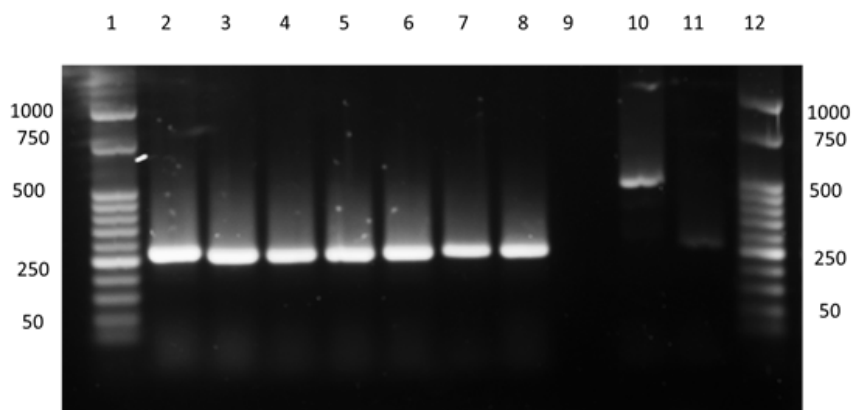


Figura 6: Productos de aplicación de los productos de PCR-Múltiple. Líneas 1 y 12: Marcadores de tamaño de fragmentos (100 pb ladder, Productos Bio-logicos), Líneas 2 a 8: muestras incógnitas de *Mycoplasma spp* (266 bp), Línea 9: control negativo de reacción, Línea 10: control interno *M. californicum* (490 bp), Línea 11: control interno *M. leachii*.

Del total de aislamientos, uno de ellos fue identificado como *M. canadense* (Figura 7), según el método de Multiplex PCR diseñado para la identificación de *M. bovis* y *M. canadense*.

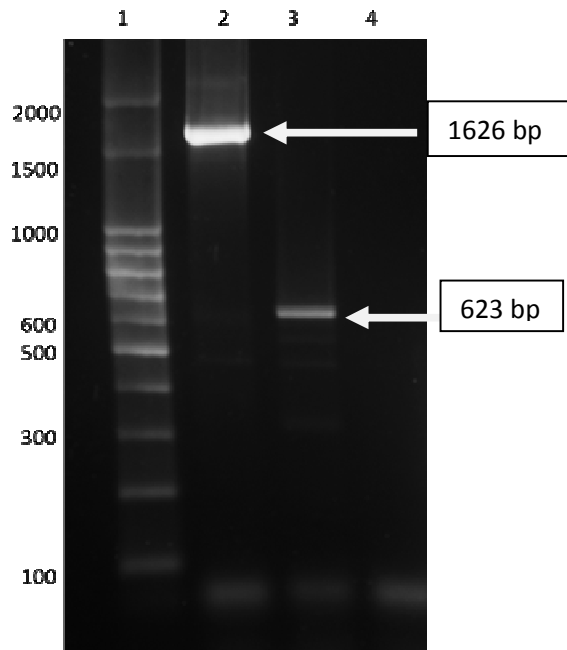


Figura 7: Amplificación de los productos de PCR-Múltiple uvr-canadense. Línea 1: Marcador molecular (100 pb ladder, Productos Bio-logicos), Línea 2: control interno *M. bovis*, Línea 3: control interno *M. canadense*, Línea 4: control negativo.

En la tabla 11 se presenta la frecuencia de especies de *Mycoplasma* aisladas y su origen clínico.

Tabla 11. Frecuencia y origen de las especies de *Mycoplasma* aisladas

Especie de <i>Mycoplasma</i>	Número y porcentaje sobre total de aislados	Origen (número de aislados)
<i>M. bovis</i>	3 (7,32%)	Leche de tanque (2), artritis (1)
<i>M. californicum</i>	6 (14,64%)	Infección mamaria (4), leche de tanque (2)
<i>M. canadense</i>	1 (2,44%)	infección mamaria
<i>M. leachii</i>	31 (75,6%)	Infección mamaria (21), leche de tanque (6), artritis (3), absceso mandibular (1),
<i>Total</i>	41 (100%)	

V DISCUSSION

V. DISCUSION

En el presente trabajo se informan los aislamientos de distintas especies de *Mycoplasma* aislados de afecciones que afectan al ganado bovino en la cuenca lechera central Argentina. Los especímenes clínicos correspondieron a un muestreo de conveniencia, basado en muestras remitidas por médicos veterinarios que sospechaban la presencia de infecciones por *Mycoplasma* en establecimientos visitados, por lo cual la determinación de la prevalencia de infección en los rodeos supera los objetivos de este trabajo. La identificación de microorganismos nativos no solo es una herramienta útil para conocer las especies que habitualmente están presentes en una región, sino que también es de gran importancia para el desarrollo de investigaciones sobre el mecanismo de infección y para estudios de epidemiología molecular, que determina la relación genética de los aislamientos, su asociación a un brote de enfermedad o el reconocimiento de cepas virulentas.

Dentro de las especies de *Mycoplasma*, *M. bovis* es un importante patógeno que causa enfermedades respiratorias, mastitis y artritis en el ganado. Se encuentra en todo el mundo y se ha extendido a nuevas áreas incluyendo Irlanda y algunos países de América del Sur en la última década. En Europa es responsable de al menos un cuarto de todas las neumonías en terneros (Nicholas, 2003). Uno de los países pioneros en la búsqueda e identificación de este patógeno es E.E.U.U de Norteamérica donde se ha aislado con frecuencia a *M. bovis* tanto de vacas como de terneros, alcanzando un 60% de los aislados (Maunsell, 2009; Boonyayatra, 2011); para los cuales se han desarrollado

metodologías analíticas moleculares tanto de PCR convencional como de polimorfismos de fragmentos de restricción (Boonyayatra, 2011).

La variabilidad en la prevalencia de este patógeno en el mundo es diversa, en Bélgica se observó que solo el 1,5% de las vacas lecheras excretaban *M. bovis* en leche (Passchyn, 2012), mientras en Portugal la prevalencia en leche de tanque fue del 2,4% (Pinho 2013) y en Japón el 2,56% hallado entre otros *Mycoplasma* (Higuchi, 2011). En el presente estudio, el hecho de tratarse de un muestreo de conveniencia no permite efectuar comparaciones acerca de la prevalencia de este patógeno. El organismo fue aislado a partir de muestras de leche de tanque y de una vaca con artritis en un establecimiento lechero. En nuestro país, la presencia de *M. bovis* fue descrita por Cerdá y col. (2000) como causante de un brote de mastitis clínicas refractarias a la terapia antibiótica en un establecimiento lechero de la Prov. de Buenos Aires. Posteriormente, Tamiozzo y col. (2104) informaron que en un total de 14 aislamientos obtenidos a partir de leche de cuartos mamarios y tanque de frío caracterizados como *Mycoplasma* spp, la mitad fueron identificados como *M. bovis*. Considerando que *M. bovis* es la especie de *Mycoplasma* más frecuentemente aislada a partir de bovinos en otros países (Maunsell, 2011), sería deseable realizar estudios sistemáticos en nuestro país para determinar su prevalencia en los establecimientos lecheros.

Mycoplasma californicum es una de las especies más frecuentemente aislada de casos de mastitis bovina (González y Wilson, 2003). Se han descrito casos tanto en los EE.UU. de Norteamérica, como en Japón (Jasper, 1981; Hata, 2014). Recientemente fue descrita su presencia en Argentina a partir de muestras de leche de cuartos mamarios y

tanque de frío, aunque no se brindó información sobre los casos (Tamiozzo, 2014). La presentación de esta especie ha sido descrita en forma de brotes de mastitis clínicas, posiblemente originados a partir de descargas urogenitales en vacas infectadas en forma subclínica (Fox, 2005). En el presente estudio este organismo fue aislado a partir de un brote de mastitis refractarias a la terapia antibiótica, así como de leche de tanque del mismo establecimiento. Si bien por tratarse de un establecimiento comercial no se pudieron realizar estudios posteriores, el método de diagnóstico desarrollado, permitirá en el futuro realizar estudios para determinar la importancia de esta especie en los rodeos lecheros.

En el año 1976, se describe una nueva especie de *Mycoplasma* que afecta el tracto genital bovino y siendo también causante de mastitis en el rodeo, problemas en las articulaciones y onfalitis en terneros, conocido como *Mycoplasma canadense* (Langford, 1976). En forma similar a *M. californicum*, esta es una de las especies más frecuentemente asociadas a brotes de mastitis (González y Wilson, 2003; Fox, 2005). En el presente estudio se aisló solamente una cepa de un caso de mastitis. Recientemente Tamiozzo et al. (2014) informaron el aislamiento de esta especie a partir de muestras de leche en nuestro país.

Existe en el universo de especies, un *cluster* de *Mycoplasma mycoides* cuyo origen del grupo se remonta a 10.000 años atrás, lo que sugiere que el establecimiento y difusión del *cluster* coincide con la domesticación del ganado (Fischer, 2012), el mismo consiste en seis tipos de *Mycoplasma* patogénicos que causan enfermedades en los rumiantes. Este cluster está compuesto por cinco taxones reconocidos y tres subclusters,

los cuales corresponden a *Mycoplasma mycoides* subespecies, *Mycoplasma caprilicum* subespecies y la nueva especie *Mycoplasma leachii* (Manso-Silvan, 2009), este último también conocido anteriormente como *Mycoplasma* sp. Bovine grupo 7 (Djordjevic, 2003; Tardy, 2009), por lo tanto *M. leachii* es una nueva designación de la especie *Mycoplasma* sp. Bovino grupo 7, el cual fue inicialmente hallado de fluidos articulares de terneros artríticos en Australia e informado su aislamiento en el ganado de China (Chang, 2011). En el presente estudio, se identificó *M. leachii* en muestras tanto de leche de tanque, infecciones mamarias, artritis y un absceso perimandibular. Los especímenes clínicos pertenecían a distintos animales de un mismo establecimiento. Cabe destacar que, de acuerdo con la bibliografía consultada, este es el primer informe sobre aislamiento de *M. leachii* en Argentina.

El diagnóstico microbiológico que se realiza a través de métodos moleculares, como la amplificación del ADN por la técnica de PCR y sus variantes, demuestra ser una herramienta eficaz por su alta sensibilidad, especificidad y rapidez, sobre todo en la detección de patógenos extremadamente exigentes en su viabilidad y multiplicación *in vitro*, como lo son las especies de la clase *Mollicutes*. Numerosos autores utilizan los métodos de diagnóstico de PCR para la identificación de especies de *Mycoplasma* considerándolo como un método rápido y sensible para la detección de estos patógenos (Miles, 2004; Amores, 2010; Sung, 2006; Chávez González, 1995; Takashi, 1992; Higuchi, 2011); sin embargo, no hay información sobre la aplicación y desarrollo de Multiplex PCR como la desarrollada en este estudio. Si bien es deseable lograr una técnica de Multiplex PCR que amplifique la mayor cantidad de fragmentos distintos para

discriminar entre cepas, debe considerarse que teniendo un solo target de amplificación como fue el gen específico *uvrC*, estas posibilidades se ven limitadas. Esto podría lograrse con tecnologías más sofisticadas, pero a su vez de mayor costo. Consecuentemente, con el uso de dos reacciones de PCR se puede discriminar entre las especies aisladas con mayor frecuencia en el país hasta el momento.

Los resultados de esta investigación confirman la presencia de estos patógenos en muestras tanto de leche de tanque y cuartos mamarios, como de líquido articular de vacas y terneros y abscesos mediante técnicas moleculares al alcance de laboratorios de complejidad mediana. Este nivel de identificación será de gran utilidad para la realización de estudios epidemiológicos que permitirán generar información sobre la prevalencia y difusión de estos patógenos en los rodeos lecheros.

VI CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

- La amplificación de la región 16S de los aislamientos de *Mycoplasma* permitió la identificación a nivel de género, confirmando la identidad de los aislados obtenidos por metodología clásica de cultivo.
- La prueba de PCR para la detección de *M. bovis*, dirigida al gen *uvr*, mostró una buena especificidad.
- La amplificación y secuenciación de la región 16S RNAr de las cepas de *Mycoplasma* permitió desarrollar los primers para la realización de dos Multiplex PCR para identificar las especies aisladas a partir de especímenes obtenidos de rodeos lecheros.
- La implementación de las dos técnicas de Multiplex PCR permitió identificar a nivel de género y especie de aislamientos pertenecientes a: *Mycoplasma bovis*, *M. californicum*, *M. canadense* y *M. leachii*, contribuyendo al estudio de las especies y constituyendo una herramienta eficaz para futuros estudios epidemiológicos.

VII REFERENCIAS BIBLIOGRFICAS

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- Allassia, M., Mazzini R., Machado S, Russi N.B., Neder V.E, Calvino L.F. Aislamiento de *Mycoplasma* spp. en un ternero de tambo. Resúmenes de la XIX Reunión Científica Técnica de la AAVLD. Buenos Aires, 7-9/11/2012.Pp. 164-165.
- Almeida, R.A.1982 Neumonía en terneros de tambo. Etiología y Patología. Rev. Med. Vet. (Bs. As.) 63:157-170.
- Amores J., Corrales J, Gomez Martin A., Sanchez A., Contreras A., Christian De La Fe. 2010. Comparison of culture and PCR to detect *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. capri in ear swabs taken from goats. Veterinary Microbiology 140, pag. 105 -108.
- Arcangiolia MA, Chazelb M, Sellalc E, Botrelb MA, Bézillea P, Poumaratb F, Calavasb D & D Le Grand. 2011. Prevalence of *Mycoplasma bovis* udder infection in dairy cattle: Preliminary field investigation in southeast France. New Zealand Vet. J. 59:75-78.
- Baird, S; Carman, J; Dinsmore, R; Walker, R; Collins, J.1999. Detection and identification of *Mycoplasma* from bovine mastitis infections using a nested polymerase chain reaction. J. Vet Diagn Invest 11:432-435.

- Beier T, Hotzela H, Lysnyanskyb I, Grajetzki C, Hellera M, Rabelinga B, Yogevb D, Sachsea K.1998. Intraspecies polymorphism of vsp genes and expression profiles of variable surface protein antigens (Vsps) in field isolates of *Mycoplasma bovis*. Vet. Microbiol. 63:189 - 203.
- Bej, A.K; Mahbubani M.H. y Atlas R.M. 1991. Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and there applications. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 26:301-334.
- Bigatti, C., Echevarría, H., Catena, M., Monteavaro, C., Soto, P. Aislamiento de *Mycoplasma* en semen bovino congelado comercial. XVIII Reunión Científico Técnica A.A.V.L.D. 2010. P. 75.
- Brock, T., Madigan M. MYCOPLASMA. En: Brock T, Madigan M, editores. Biology of Microorganisms.6ta edicion, Prentice-Hall International Inc. 2001, p.779-82.
- Brown, D.; Whitcomb R. and Brdbury J. 2007. Revised minimal standards for description of new species of the class *Mollicutes* (division *Tenericutes*). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57, 2703-2719.
- Browning, G.F., Marena, M.S., Markham, P.F., Noormohammadi, A.H., Whithear, K.G. 2010. *Mycoplasma*. In: Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, 4th Ed.

(C L Gyles, J F Prescott, J G Songer, C O Thoen (Eds.) Blackwell Publishing. Pp. 549-574. primary *Mycoplasma* species causing mastitis. J. Dairy Sci. 95: 196-205. 2012.

- Boonyayatra S, Fox L., Besser T, Sawant A, Gay J, Raviv Z. A. 2012. PCR assay and PCR-restriction fragment length polymorphism combination identifying the 3 primary *Mycoplasma* species causing mastitis. J Dairy Sci. Jan;95(1):196-205. doi: 10.3168/jds.2011-4531.
- Butler, J.A; Sickles, S.A; Johanns, C. J; Rosenbusch, R. F.2000. Pasteurization of discard *Mycoplasma* Mastitic Milk used to feed calves: thermal Effects on various *Mycoplasma*. J. Dairy Sci 83:2285-2288.
- Carter, G.R.1985 .Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology. Michigan State University Press.
- Chang Ji-Tao, Lui Hai-Jun and Li Yu. 2011. *Mycoplasma leachii* sp. Nov. In Calves, China. Emerg Infect Dis. Sep; 17(9): 1772-1773.
- Chávez González Y, Ros Bascunana C, Bolske G, Mattsson J, Fernández Molina C, Johansson C. 1995. In Vitro amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma* *Boris* and *Mycoplasma agalactiae* by PCR. Veterinary Microbiology 47, pag 183-190.

- Cerda R, Xavier J, Sansalone P, De la Sota R y Rosenbush R. 2000. Aislamiento de *Mycoplasma bovis* a Partir de un Brote de Mastitis Bovina en una Vaquería de la Provincia de Buenos Aires. Primera Comunicación en la República Argentina. Revista Latinoamericana de Microbiología 42:7-11.
- Cremonesi P, Castiglione B, Malferrari G, Biunno I, Vimercati C, Moroni P, Morandi S and Luzzana M. 2006. Improved Method for Rapid DNA Extraction of Mastitis Pathogens Directly from Milk. J. Dairy Sci. 89: 163-169.
- Dieffenbach, C.W y Dvksler G.S. 1995. PCR primer: a laboratory manual. CSHL Press, Cold Spring Harbor, EUA.
- Djordjevic S, Vilei E and Frey J.2003. Characterization of a chromosomal region of *Mycoplasma* sp. bovine group 7 strain PG50 encoding a glycerol transport locus (*gts ABC*). Microbiology, 149, 195-204.
- Fadiel, A., Eichenbaum, K. D., EL Semary, N., & Epperson, B. (2007). Mycoplasma genomics: tailoring the genome for minimal life requirements through reductive evolution. Front Biosci, 12, 2020-2028.

- Fischer A, Shapiro B, Muriuki C, Heller M, Schnee C, Bongcamrudloff E, Vilei E, Frey J, Jores J. 2012. The Origin of the “*Mycoplasma mycoides* Cluster” Coincides with Domestication of Ruminants. Plos ONE Vol. 7, Issue 4.
- Filioussis G., Christodoulopoulos G., Thatcher A, Petridou V, Bourtzi-Chatzopoulou E. 2007. Isolation of *Mycoplasma bovis* from bovine clinical mastitis cases in Northern Greece. The Veterinary Journal 173, 215–218.
- Fox L.K; Hancock D.D; Mickelson A; Britten A. 2003. Bulk Tank milk analysis: Factors Associated with appearance of *Mycoplasma* sp. In milk.J.Vet.Med. B50; 235-240.
- Fox L.K; Kirk, J.H., Britten A. 2005. *Mycoplasma* Mastitis: A Review of Transmission and Control. J. Vet. Med. B 52, 153–160
- Garg D. N. 2009. *Mycoplasmas* of Zoonotic Significance. College of Veterinary Sciences C.C.S. Haryana Agricultural University Hisar-125 004, Haryana, India.
- Garrity GM, Lilburn TG, Cole JR, Harrison SH, Euzéby J, Tindall BJ. 2007. The Bacteria: Phylum Firmicutes, Class Mollicutes. The Taxonomic outline of the Bacteria and Archaea; 8:317-32. Disponible en: <http://www.taxonomicoutline.org/>.

- Ghadersohi A, Hirstab R.G, Forbes-Faulkenerc J, Coelen R.1999. Preliminary studies on the prevalence of *Mycoplasma bovis* mastitis in dairy cattle in Australia. *Veterinary Microbiology* 65; 185 – 194.
- González, R. *Mycoplasma Mastitis In Dairy Cattle: If Ignored, It Can Be a Costly Drain On the Milk Producer*. Published in the 1996 National Mastitis Council Regional Meeting Proceedings, pg. 37.
- González, R., Wilson D.J. 2003. Mycoplasmal mastitis in dairy herds. *Vet Clin Food Anim* 19; 199–221.
- Hayflick L. and Robert M. 1965. Chanock *Bacteriol. Mycoplasma Species of Man Rev.* 29(2):185.
- Hata Eiji, Kan-ichiro Suzuki, Hideki Hanyu, Megumi Itoh, Hidetoshi Higuchi, Hideki Kobayashi. 2014. Molecular Epidemiology of Cases of *Mycoplasma californicum* Infection in Japan. *Journal ASM*, Vol.80, number 24, p. 7717-7724.
- Hidetoshi H., Hidetomo I., Kazuhiro K., Takehiro O., Tetsu O., Hirose K., Nobuhiko I., Horoshi Y., Yutaka T., Hajime N. 2011. A simplified PCR assay for fast and easy mycoplasma mastitis screening in dairy cattle. *J. Vet. Sci.* 12(2), 191-193.

- Hirose K, Kawasaki Y, Kotani K, Tanaka A, Abiko K. 2001. Detection of Mycoplasma in mastitic milk by PCR analysis and culture method. J. Vet. Med. Sci. 63(6): 691-693.
- Hopert A, Uphoff CC, Wirth M, Hauser H, Drexler HG. 1993. Specificity and sensitivity of polymerase chain reaction (PCR) in comparison with other methods for the detection of mycoplasma contamination in cell lines. J Immunol Methods. Aug 26;164(1):91-100.
- Kiyoso A, Takashi U, Tomoko N, Ikunoshin K, Naohiro S and Harasawa R. 1993. Sequence Analysis of the 16S-23S Spacer Region in rRNA Operons of the *Mollicutes*. Bull. Inst. Chem. Res., Kyoto Univ., Vol. 71, N 3.
- Jasper D.E, Ern H., Dellinger J.D. and Christiansen C. 1981. *Mycoplasma californicum*, a New Species from Cows. International Journal of Systematic Bacteriology, Vol.31, N°3, p.339-345.
- Laak E.A, Wentink G.H, Zimmer G. M. 1992. Increased prevalence of *Mycoplasma Bovis* in the Netherlands. Veterinary Quarterly; 15: 100-4.
- Langford E.V., Louise Ruhnke H. and Onoviran O. 1976. *Mycoplasma canadense*, a New Bovine Species. International Journal of Systematic Bacteriology, Vol.26, N°2, p. 212-219.

- McAuliffe L, Kokotovic B, Ayling D and Nicholas R. 2004. Molecular Epidemiological Analysis of *Mycoplasma bovis* Isolates from the United Kingdom Shows Two Genetically Distinct Clusters. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 4556-4565.
- Madoff S; Pixley B; DelGuidice R; Moellering R. 1979. Isolation of *Mycoplasma bovis* from a patient with systemic illness- *Journal of clinical Microbiology*, p.709-711.
- Manso – Silvan L., Vilei E, Sachse K, Djordjevic S, Thiaucourt F and Frey J. 2009. *Mycoplasma leachii* sp. Nov. as a new species designation for *Mycoplasma* sp. Bovine group 7 pf Leach, and reclassification of *Mycoplasma mycoide* subsp. *mycoides* LC as a serovar of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 1353-1358.
- Maunsell F y Donovan A. 2009. *Mycoplasma bovis* Infections in young calves. *Vet Clin Food Anim.* 25, 139-177.
- Maunsell F, Woolumns A, Francoz D, Ronsenbusch R, Step D, Wilson D, Janzen E. 2011. *Mycoplasma bovis* Infections cattle. *J. Vet Intern Med* 25, 772-783.

- Miles K, McAuliffe L, Ayling R, Nicholas R. 2004. Rapid detection of *Mycoplasma dispar* and *M. bovirhinis* using allele specific polymerase chain reaction protocols. FEMS Microbiology letters 241, 103-107.
- Muñoz G y Sotomayor P. 1990. Conditions for growing *Mycoplasma canadense* and *Mycoplasma verecundum* in a serum-free medium. Applied and Environmental Microbiology, pag. 2259-2261.
- Neder, V; Gianre, V; Calvinho, L. 2013 Detección y Caracterización molecular de *Mycoplasma* aislados de leche de tanque de frío e infecciones mamarias en la cuenca lechera central de Argentina. Poster. Congreso Argentino de Microbiología 24-26 de septiembre de 2013.
- Neder, V., Signorini, M., Cuatrin, A., Gianre, V., Calvinho, L. 2014. Prevalencia de bacterias patógenas de mastitis bovina en leche de tanque de frío y evaluación de medios de cultivo para el recuento y la identificación de *Staphylococcus aureus*. Revista FAVE Sección Ciencias Veterinarias, 13(1/2), 20-27.
- Nicholas R.A, Ayling R.D. 2003. *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis, and control. Research in Veterinary Science 74, 105–112.

- Nicholas R and Baker S. 1998. Recovery of Mycoplasma from Animals. Methods in Molecular Medicine, Vol. 104: Mycoplasma Protocols.
- Passchyn P, Piepers S, De Meulemeester L, Boyen F, Haesebrouck F, De Vlieghe S. 2012. Between-herd prevalence of *Mycoplasma bovis* in bulk milk in Flanders, Belgium. Res Vet Sci. Apr;92(2):219-20.
- Pinho L., Thompsona G, Machadoc M, Carvalheira J. 2013 Management practices associated with the bulk tank milk prevalence of *Mycoplasma* spp. in dairy herds in Northwestern Portugal. Preventive Veterinary Medicine 108, 21– 27.
- Razin S. 1978. The mycoplasmas. Microbiol. Rev., 42(2):414.
- Razin, S. 1985 Molecular Biology and Genetics of Mycoplasmas (Mollicutes). Microbiol. Rev., 49, 419-455.
- Razin S. 1994 .DNA probes and PCR in diagnosis of mycoplasma infections. Molecular and Cellular Probes Volume 8, Issue 6, Pages 497–511.
- Rocha, E. P. y Blanchard, A. (2002). Genomic repeats, genome plasticity and the dynamics of Mycoplasma evolution. Nucleic acids research, 30(9), 2031-2042.

- Rosenbusch R. F, Kinyon J., Apley M, Fluck N, Smith S and. Hoffman L.2005.In Vitro Antimicrobial Inhibition Profiles of *Mycoplasma bovis* Isolates Recovered from Various Regions of The United States from 2002 to 2003. J VET Diagn Invest, 17:436.
- Stradaoli G, Sbylla L, Mbazzarelli F, Roth M, Zbelli R , Rcawadi G, Mbonaci M.1999. *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC identification by PCR in sperm of seminal vesiculitis-affected bulls.Vet. Res. 30, 457-466.
- Sickles A, Kruze J, Gonzales R. 2000. Aislamiento de *Mycoplasma bovis* en muestras de leche de estanque en rebaños lecheros del sur de Chile. Arch. med. vet. v.32 n.2 Valdivia.
- Soehnlén M, Kunze E, Karunathilake K, Henwood B, Kariyawasam S, Wolfgang D and Jayarao B. 2011 In vitro antimicrobial inhibition of *Mycoplasma bovis* isolates submitted to the Pennsylvania Animal Diagnostic Laboratory using flow cytometry and a broth microdilution method. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 23: 547.
- Sung H, Seung Hye Kang, Yoon Jin Bae, Jin Tae Hong, Youn Bok Chung and Sukgil Song. 2006. PCR-Based detection of Mycoplasma Species. The Journal Of Microbiology, February, p.42-49.

- Takashi U, Kiyozo A, Kato I and Harasawa R. 1992. Amplification of the 16S-23S Spacer Region in rRNA Operons of Mycoplasmas by the Polymerase Chain Reaction. System. Appl. Microbiol. 15, 181-186.
- Tang, J; Hu, M., Lee, S; Roblin, R. 2000. A polymerase chain reaction based method for detecting *Mycoplasma/Acholeplasma* contaminants in cell culture. Journal of Microbiological Methods 39 (2000) 121-126.
- Tamiozzo, P.J; Estangueta A, Maito J, Tirante L, Pol M, Giraud J.2014. Detection of *Mycoplasma canadense* and *Mycoplasma californicum* in dairy cattle from Argentina. Rev. Arg. Microbiol.46:119-121.
- Tardy, F, Maigre L, Poumarat F and Citti C. 2009. Identification and distribution of genetic markers in three closely related taxa of the *mycoplasma mycoides* cluster: refining the relative position and boundaries of the *Mycoplasma* sp. Bovine group 7 taxon (*Mycoplasma leachii*). Microbiology, 155, 3775-3787.
- Tirante, L. Neder, V., Maito, J., Gavidia, M., Baumberger, C., Chaves, J., Pol, M., Canavesio, V., Calvinho, L.2013. Mycoplasma mastitis in dairy cattle in Argentina. Proceedings National Mastitis Council 52 Annual Meeting. San Diego, EE.UU.

- Thomas Anne, Dizier I, Linden A, Mainil J, Frey J, Vilei E. 2004. Conservation of the *uvrC* gen sequence in *Mycoplasma bovis* and its use in routine PCR diagnosis. The Veterinary Journal 168, 100-102.
- Vyletelova, M. 2010. The Survival of *Mycoplasma bovis* at different temperatures. Czech J. Food Sci., 28: 74-78.
- Wilmotte A, Gert Van der A and Rupert De Wachter. 1993. Structure of the 16S ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium *Chlorogloeopsis* HTF (*Mastigocladus laminosus* HTF) strain PCC7518, and phylogenetic analysis. FEBS Vol 317, number 1,2, 96-100.

VIII. ANEXO/APENDICE.

VIII. ANEXO/APENDICE.

APENDICE I: ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS PARA LAS CEPAS 13, 14,

15 33, 4E y 66.

